

**NEUE SCHWEFELHALTIGE INHALTSSTOFFE
AUS ALLIUM CEPA L. MIT ANTIASTHMATISCHER
UND ANTIALLERGISCHER WIRKUNG**

THOMAS BAYER

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Neue schwefelhaltige Inhaltsstoffe aus
Allium cepa L.
mit antiasthmatischer und antiallergischer Wirkung

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Thomas Bayer
aus
Dachau/Obb.

Juni 1988

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Wagner
 2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Severin
 3. Berichterstatter: PD Dr. med. habil. W. Dorsch
- Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 1988

für meine Eltern

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. E I N L E I T U N G	1
B. A L L G E M E I N E R T E I L	2
I. <u>Kenntnisstand</u>	2
I.1. Allium cepa L.	2
I.1.1. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	2
I.1.2. Volksmedizin und Pharmakologie	3
I.1.2.1. Die Zwiebel in Volksmedizin und Homöopathie	3
I.1.2.2. Bisherige pharmakologische Untersuchungen ..	3
I.2. Allium sativum und andere Allium Arten	5
I.2.1. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	5
I.2.2. Volksmedizin und Pharmakologie	7
I.2.2.1. Knoblauch in Volksmedizin und Homöopathie ..	7
I.2.2.2. Bisherige pharmakologische Untersuchungen ..	7
II. <u>Aufgabenstellung</u>	8
CHEMISCH-ANALYTISCHER ABSCHNITT	9
I. <u>Auffindung des aktiven Prinzips</u>	9
I.1. Voruntersuchungen	9
I.2. Extraktsscreening	9
I.2.1. Testmethode	9
I.2.2. Untersuchte Extrakte	10
I.2.2.1. Wasserdampfdestillat	10
I.2.2.2. Ohne Wärmeanwendung hergestellte Extrakte .	11
I.3. Lokalisierung des antiasthmatischen	
Wirkprinzips	12
I.3.1. Chromatographische Charakterisierung der	
Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft ..	12
I.3.1.1. Kieselgel-Dünnschichtchromatographie	12
I.3.1.2. Hochdruckflüssigchromatographie	14

I.3.2.	Fraktionierung des Extraktes	17
I.3.2.1.	Schnellfraktionierung mittels "Chromatotron"	18
I.3.2.2.	Auftrennung von Fraktion <u>II</u>	18
I.3.2.2.1.	Abtrennung unwirksamer Sterole	18
I.3.2.2.2.	Säulenchromatographie	20
I.3.2.3.	Anreicherung der Komponenten der Unter- fraktion <u>II/3</u>	22
I.4.	Isolierung der Inhaltsstoffe der Fraktionen <u>II/2</u> und <u>II/3</u>	22
I.4.1.	Substanzen der Fraktion <u>II/3</u>	22
I.4.1.1.	Verbindung <u>3</u>	22
I.4.1.2.	Verbindungen <u>1</u> und <u>2</u>	23
I.4.2.	Substanzen der Fraktion <u>II/2</u>	24
II.	Strukturaufklärung der aus den aktiven Fraktionen isolierten Verbindungen	26
II.1.	Verbindungen 1 und 2	26
II.1.1.	Voruntersuchungen	26
II.1.2.	Massenspektroskopie	26
II.1.3.	NMR-Spektroskopie	27
II.1.3.1.	80 MHz ^1H -NMR-Spektren	27
II.1.3.2.	360 MHz ^1H -und 90 MHz ^{13}C -NMR-Spektren	27
II.2.	Verbindung 7	34
II.2.1.	Voruntersuchungen	34
II.2.2.	Massenspektroskopie	34
II.2.3.	NMR-Spektroskopie	35
II.3.	Verbindungen 5 und 6	36
II.3.1.	Voruntersuchungen	36
II.3.2.	Massenspektroskopie	37
II.3.3.	NMR-Spektroskopie	37
II.4.	Verbindungen 3 und 4	40
II.4.1.	Voruntersuchungen	40
II.4.1.1.	Verbindung 3	40
II.4.1.2.	Verbindung 4	41
II.4.2.	Massenspektroskopie	41
II.4.2.1.	Verbindung 3	41
II.4.2.2.	Verbindung 4	41

II.4.3.	NMR-Spektroskopie	42
II.4.3.1.	Verbindung 3	42
II.4.3.1.1.	^1H -NMR-Spektrum	42
II.4.3.1.2.	^{13}C -NMR-Spektrum	44
II.4.3.2.	Verbindung 4	45
II.4.4.	Bestimmung der Konformation der Verbindungen 3 und 4	46
II.5.	Zusammenfassung	48
III.	<u>Untersuchung der Fraktion II/4</u>	50
III.1.	Chromatographische Charakterisierung	50
III.1.1.	Dünnschichtchromatographie	50
III.1.2.	Hochdruckflüssigchromatographie	50
III.2.	Isolierung der Hauptkomponenten	51
III.3.	Strukturaufklärung der Substanzen 4/1 bis 4/4	53
III.3.1.	Voruntersuchungen	53
III.3.2.	Massenspektroskopie	53
III.3.2.1.	Verbindungen 4/1 und 4/3	53
III.3.2.2.	Verbindungen 4/2 und 4/4	54
III.3.3.	80 MHz ^1H -NMR-Spektren	54
III.3.3.1.	Substanzen 4/1 und 4/3	54
III.3.3.2.	Substanzen 4/2 und 4/4	56
III.3.4.	Festlegung der Strukturen von 4/1 bis 4/4 .	57
III.3.4.1.	Verbindung 4/1	57
III.3.4.1.1.	Hochfeld NMR	57
III.3.4.1.2.	Weitere Strukturinformationen aus den Massenspektren von 4/1	61
III.3.4.2.	Verbindung 4/3	62
III.3.4.3.	Verbindung 4/2	63
III.3.4.3.1.	Hochfeld NMR	63
III.3.4.3.2.	Weitere Informationen aus dem Massenspektrum von 4/2	71
III.3.4.4.	Verbindung 4/4	72
III.3.4.4.1.	Hochfeld NMR	72
III.3.4.4.2.	Weitere Informationen aus dem Massenspektrum von 4/4	73

III.4.	Übersicht über die aus Fraktion II/4 isolierten Verbindungen	73
IV.	<u>Synthese von Thiosulfinssäureestern</u>	77
IV.1.	Symmetrisch substituierte Thiosulfinate ...	77
IV.2.	Asymmetrisch substituierte Thiosulfinate ..	78
V.	<u>Weitere Untersuchungen mit Zwiebelextrakten</u>	83
V.1.	Identifizierung weiterer Extraktkomponenten	83
V.1.1.	Nachweis von Dimethylthiosulfinat mittels HPLC	83
V.1.2.	Nachweis von Methylpropyl- und Propyl- methylthiosulfinat mittels HPLC	83
V.2.	HPLC-Vergleich von Extrakten verschiedener Zwiebelvarietäten	91
V.3.	Gehaltsbestimmung der Hauptthiosulfinate des Zwiebelextraktes	91
V.4.	Stabilitätsuntersuchungen mit Zwiebelextrakten	93
VI.	<u>HPLC-Analyse schwefelhaltiger Verbindungen</u>	100
PHARMAKOLOGISCHER ABSCHNITT		105
I.	<u>Asthma bronchiale</u>	105
I.1.	Begriffsbestimmung	105
I.2.	Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale	106
I.2.1.	Die wichtigsten beteiligten Zellarten	106
I.2.2.	Mediatorwirkungen	108
I.2.3.	Biosynthese wichtiger Mediatorstoffe nach Zellaktivierung	110
I.2.3.1.	Arachidonsäurekaskade	110
I.2.3.2.	Biosynthese und Stoffwechsel von PAF	110

I.3.	Eingriffsmöglichkeiten in pathologische Abläufe beim Asthma bronchiale	112
I.3.1.	Kausalthherapie	112
I.3.2.	Bronchospasmolytika	112
I.3.3.	Expektorantien	112
I.3.4.	Hemmung der Mastzelldegranulation	112
I.3.5.	Einsatz von Rezeptorantagonisten asthma- induzierender Mediatoren	113
I.3.6.	Eingriffe in den Arachidonsäurestoffwechsel	113
I.3.7.	Verminderung der Leukozytenchemotaxis	115
II.	<u>Pharmakologische Untersuchungen</u>	116
II.1.	Testsysteme	116
II.1.1.	Zum Screening in Frage kommende und verwendete in vitro Testsysteme	116
II.1.1.1.	Prüfung auf Beeinflussung der Histaminfrei- setzung aus humanen peripheren Leukozyten .	116
II.1.1.2.	Prüfung auf Beeinflussung der Thromboxan B ₂ - Biosynthese im plättchenreichen Plasma (PRP)	117
II.1.1.3.	Prüfung auf Beeinflussung der Cyclooxy- genaseaktivität	117
II.1.1.4.	Prüfung auf Beeinflussung der 5-Lipoxy- genaseaktivität	117
II.1.1.5.	Prüfung auf Beeinflussung der PAF-induzierten Chemolumineszenz humaner PMNL	118
II.1.1.6.	Prüfung auf Radikalfängereigenschaften	118
II.1.2.	Asthmamodelle in vivo	119
II.1.2.1.	Prüfung auf Beeinflussung der Allergen- -induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen	119
II.1.2.2.	Prüfung auf Beeinflussung der PAF-induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen	121
II.2.	Ergebnisse und Diskussion	122
II.2.1.	Ergebnisse und Diskussion der in vivo Versuche	122



II.2.2.	Ergebnisse und Diskussion der in vitro Versuche	126
II.2.2.1.	Beeinflussung der Histaminfreisetzung aus humanen peripheren Leukozyten	126
II.2.2.2.	Beeinflussung der Thromboxan B ₂ -Biosynthese im plättchenreichen Plasma (PRP)	126
II.2.2.3.	Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität ..	128
II.2.2.4.	Beeinflussung der 5-Lipoxygenaseaktivität ..	132
II.2.2.5.	Beeinflussung der PAF-induzierten Chemolumineszenz humaner PMNL	136
II.3.	Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse der pharmakologischen in vitro Untersuchungen ..	139
II.3.1.	Thiosulfinate	139
II.3.2.	Cepaene	139
II.4.	Versuch einer Korrelation zwischen Asthmaschutzwirkung in vivo und den in vitro Testergebnissen	141
C.	ZUSAMMENFASSUNG	143
D.	EXPERIMENTELLER TEIL	147
I.	<u>Herkunft des Drogenmaterials</u>	147
II.	<u>Allgemeine Arbeitsmethoden</u>	147
II.1.	Analytische Dünnschichtchromatographie	147
II.1.1.	Adsorbentien	147
II.1.2.	Laufmittelsysteme	147
II.1.3.	Detektionsmethoden	148
II.2.	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ..	148
II.2.1.	Apparative Daten	148
II.2.2.	Lösungsmittel	148
II.2.3.	Trennsysteme	149
II.3.	Fliehkraftbeschleunigte präparative Schichtchromatographie	150
II.3.1.	Gerät und Arbeitsweise	150

II.3.2.	Adsorbens	151
II.3.3.	Elutionsmittel	151
II.4.	Säulenchromatographie unter Stickstoffdruck: "Flash"-Chromatographie	151
II.4.1.	Verfahrensweise	151
II.4.2.	Adsorbens	152
II.4.3.	Elutionsmittel	152
II.5.	Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) mit Glassäulen	152
II.5.1.	Apparative Daten	152
II.5.2.	Pack- und Verfahrenstechnik	152
II.5.3.	Adsorbentien	153
II.5.4.	Elutionsmittel	153
III.	<u>Spektroskopische und physikalische Methoden</u>	153
III.1.	Schmelzpunkt	153
III.2.	UV-Spektren	153
III.3.	Massenspektren	153
III.4.	¹ H-NMR-Spektren	154
III.5.	¹³ C-NMR-Spektren	154
IV.	<u>Spezielle Arbeitsmethoden</u>	155
IV.1.	Extraktbereitung	155
IV.1.1.	Wasserdampfdestillat	155
IV.1.2.	Ether-Perkolat aus lyophilisiertem Zwiebelgewebe	155
IV.1.3.	Ether-Perforat aus Zwiebelpreßsaft	155
IV.1.4.	Chloroformausschüttelung aus Zwiebelpreßsaft	156
IV.2.	Extraktfraktionierung und Isolierungen	156
IV.2.1.	Grobfraktionierung mittels Chromatotron	156
IV.2.2.	Abtrennung der Triterpene durch Flash- Chromatographie	156
IV.2.3.	Fraktionierung des Extraktes mit MPLC	156
IV.2.4.	Isolierung der Substanzen 3 und 4	157

IV.2.5.	Trennung der Substanzen 1 und 2	157
IV.2.6.	Isolierung der Substanz 7	157
IV.2.7.	Trennung der Substanzen 5 und 6	157
IV.2.8.	Isolierung von 4/1 bis 4/4	158
IV.2.9.	Endreinigung isolierter Substanzen vor der spektroskopischen Untersuchung durch Flash-Chromatographie	158
IV.3.	Synthesen	158
IV.3.1.	Herkunft der Reagentien	158
IV.3.2.	Arbeitsweise	158
IV.3.2.1.	Symmetrisch substituierte Thiosulfinate ...	158
IV.3.2.2.	Asymmetrisch substituierte Thiosulfinate ..	159
IV.3.2.3.	Reinigung der Produkte	159
IV.4.	Gehaltsbestimmungen	160
IV.5.	Stabilitätsuntersuchungen	161
IV.5.1.	Langzeitlagerungsversuch	161
IV.5.2.	Streßtests	161
IV.5.3.	Auswertung	161
V.	<u>Physikalische Daten</u>	162
V.1.	Isolierte Substanzen	162
V.1.1.	Verbindung 1	162
V.1.2.	Verbindung 2	162
V.1.3.	Verbindung 3	162
V.1.4.	Verbindung 4	163
V.1.5.	Verbindung 5	163
V.1.6.	Verbindung 6	164
V.1.7.	Verbindung 7	164
V.1.8.	Verbindung 4/1	164
V.1.9.	Verbindung 4/2 A	165
V.1.10.	Verbindung 4/2 B	166
V.1.11.	Verbindung 4/3	166
V.1.12.	Verbindung 4/4 A	167
V.1.13.	Verbindung 4/4 B	167
V.2.	Synthetische Substanzen	168
V.2.1.	Dimethylthiosulfinat	168

V.2.2.	Dipropylthiosulfinat	168
V.2.3.	Methylpropyl-, Propylmethylthiosulfinat (Isomere ngemisch)	168
V.2.4.	Diallylthiosulfinat	168
V.2.5.	Methylphenylthiosulfinat	169
V.2.6.	Phenylmethylthiosulfinat	169
V.2.7.	Diphenylthiosulfinat	169
VI.	<u>Pharmakologische Methoden</u>	170
VI.1.	Pharmakologische Untersuchungen in vitro ..	170
VI.1.1.	Prüfung auf Beeinflussung der Histaminfrei- setzung aus humanen peripheren Leukozyten .	170
VI.1.2.	Prüfung auf Beeinflussung der Thromboxan B ₂ -Biosynthese im plättchenreichen Plasma (PRP)	170
VI.1.3.	Prüfung auf Beeinflussung der Cyclooxy- genaseaktivität	171
VI.1.4.	Prüfung auf Beeinflussung der 5-Lipoxy- genaseaktivität	172
VI.1.5.	Prüfung auf Beeinflussung der PAF-indu- zierten Chemolumineszenz humaner PMNL	172
VI.1.6.	Prüfung auf Radikalfängereigenschaften	174
VI.2.	Pharmakologische Untersuchungen in vivo ...	174
VI.2.1.	Prüfung auf Beeinflussung der Allergen- induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen	174
VI.2.2.	Prüfung auf Beeinflussung der PAF- induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen	175
E. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S		176

A. EINLEITUNG

Kürzlich wurde von DORSCH [1] in tierexperimentellen Untersuchungen und an Asthmapatienten gezeigt, daß Extrakte von Allium cepa L., der "Küchenzwiebel", eine reproduzierbare asthmaprotektive Wirkung besitzen. Damit konnte eine schon jahrzehntelang bekannte und in der Volksmedizin genutzte Anwendung wissenschaftlich belegt werden.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, die für diese Wirkung verantwortlichen Wirkstoffe aufzufinden, zu isolieren und strukturell aufzuklären. Hierfür war es notwendig, die chromatographische Fraktionierung des Extraktes mit einem gut reproduzierbaren, aussagekräftigen in vitro- und/oder Tiermodell zu kombinieren.

Hintergrund für diese Zielsetzung bildet die Tatsache, daß wir in der heutigen Arzneimitteltherapie des Asthmas zwar eine Reihe von symptomatisch wirkenden, aus dem Naturstoffbereich stammenden Asthmamittel wie z.B. Theophyllin, Ephedrin, Atropin, Glucocorticoide oder die von Khellin abgeleitete Cromoglicinsäure besitzen, aber zur kausalen Behandlung des allergischen Asthmas bis heute nur die Antigenkarenz oder die Hyposensibilisierung vorweisen können.

In der vorliegenden Arbeit werden die erfolgreichen Versuche zur Aufklärung des antiasthmatischen Wirkprinzips von Allium cepa L. in zwei Abschnitten beschrieben.

B. ALLGEMEINER TEIL

I. Kenntnisstand

I.1. Allium cepa L.

I.1.1. Bisher bekannte Inhaltsstoffe:

Über die bis zum Jahre 1974 in Allium cepa L. nachgewiesenen Verbindungen (Flavonoidglykoside und Aglyka, andere phenolische Verbindungen, freie Aminosäuren, Enzyme, Vitamine, Sterole sowie Mono-, Di-, Oligo- und Polysaccharide) berichtete erstmals in einer zusammenfassenden Darstellung Michahelles [2]. Dort wird auch ein Überblick über die ältere Literatur gegeben.

Die charakteristischen genuinen Inhaltsstoffe der inneren Zwiebeln sind - wie bei allen Allium-Arten - (+)S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxide. In Allium cepa L. wurden Methyl-, Propyl- und 1-Propenylcysteinsulfoxid nachgewiesen [3,4,5]. Aus diesen geruchlosen Cysteinderivaten werden bei Gewebeerstörung durch Alliinasen die Substanzen gebildet, die für den Zwiebelgeruch verantwortlich sind [6,7].

Die Zusammensetzung des Zwiebelaromas war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen [8,9,10,11,12,13]. In Wasserdampfdestillaten und lipophilen Extrakten von Allium cepa L. wurden eine Vielzahl von flüchtigen Komponenten nachgewiesen, die überwiegend aus den Stoffklassen der Thiole, Mono-, Di-, Tri- und Polysulfide, Thiosulfonate, Thiophene, Alkohole, Aldehyde und Ketone stammen [14]. Als instabile Intermediärstoffe wurden Thiosulfinsäureester postuliert und später durch Umsetzung zu stabilen Reaktionsprodukten identifiziert [15,16].

Als weitere Verbindungen konnten Adenosin [2] und Cycloalliin [17] sowie der äußerst instabile Tränenfaktor, das aus 1-Propenyl-cysteinsulfoxid [18] entstehende Thiopropanal-S-Oxid, nachgewiesen werden.

1980 wurde auch über das Vorkommen sehr geringer Mengen Prostaglandin A₁ [19] berichtet. Im Jahre 1985 wurde das Vorliegen

von 9,10,13-Trihydroxi-11-octadecensäure und von 9,12,13-Trihydroxi-10-octadecensäure beschrieben [20]. Beide Säuren besaßen eine ähnliche Aktivität wie das Prostaglandin E.

I.1.2. Volksmedizin und Pharmakologie

I.1.2.1. Volksmedizin und Homöopathie:

Seit langem findet Allium cepa L. in der Volksmedizin Anwendung. In Kräuterbüchern [21,22] wird eine Vielzahl von Indikationen für frische oder gekochte Zwiebeln, für Tinkturen, Sirupe und andere Zubereitungen angegeben. Am häufigsten genannt werden positive Wirkungen bei Erkrankungen der Atemwege (Heiserkeit, Husten, Verschleimung, "chronischer Brustkatarrh" etc.) und des Verdauungstraktes (schlechte Verdauung, Obstipation, Blähungen).

Äußerlich dienen rohe Zwiebeln als hautreizendes Mittel z.B. bei Abszessen und zur Behandlung entzündlicher Hautreaktionen. Die Homöopathie empfiehlt Allium cepa L. meist in der D₄ Potenz als Schnupfenmittel sowie zur Behandlung von Neuralgien, bei Husten, Leibschmerzen und Blähungen.

I.1.2.2. Bisherige pharmakologische Untersuchungen:

Wissenschaftlich belegt wurde als erstes der Einfluß von Zwiebel-extrakten auf die Thrombozytenaggregation und Fibrinolyse. MENON u. Mitarb. [23] stellten 1968 erstmals in Probandenversuchen die Erhöhung der durch eine fettreiche Mahlzeit verminderten fibrinolytischen Aktivität durch gekochte Zwiebeln fest. Es folgten Berichte über eine in vivo Hemmung der Thrombozytenaggregation nach Einnahme gebratener Zwiebeln [24] und eine in vitro Hemmung der Thrombozytenaggregation durch wässrige und ethanolische Zwiebelextrakte [25]. MICHAELLES [2] und WEISENBERGER [26] identifizierten 1972 Adenosin als einen aggregationshemmenden Inhaltsstoff von Allium sativum L. bzw. Allium cepa L.. Ein Wasserdampfdestillat und ein Etherextrakt aus Zwiebeln sowie Cycloalliin erwiesen sich als fibrinolyseaktivierend [27].

Über die möglichen Wirkungsmechanismen der Extrakte war zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt. Erst im Jahre 1979 stellten MAKHEJA u. Mitarb. einen Zusammenhang zwischen Hemmung der Thrombozytenaggregation und Verminderung der TXB₂-Biosynthese in vitro durch einen Chloroformextrakt aus Zwiebeln fest [28]. Weitere Berichte über Einflüsse von Zwiebelextrakten auf den Cyclooxygenase- (aber auch Lipxygenase-) katalysierten Arachidonsäuremetabolismus folgten: Mit lipophilen Lösungsmitteln hergestellte Extrakte aus Zwiebeln sowie Wasserdampfdestillate aus Zwiebeln (oft ungenau als Zwiebelöle bezeichnet) verminderten die TXB₂-Biosynthese in Thrombozyten [29] und inhibierten die Cyclooxygenase und Lipxygenasen in vitro [30]. Ein wässriger Extrakt dagegen verminderte zwar die Thrombozytenaggregation, hatte aber kaum Auswirkungen auf die TXB₂-Biosynthese [31]. Diese Arbeiten zeigen, daß in "lipophilen" Extrakten aus Allium cepa L. bisher nicht charakterisierte Wirksubstanzen vorliegen müssen, die Einfluß auf den Arachidonsäuremetabolismus besitzen.

Das Vorkommen von Alliin als Hemmstoff der Thrombozytenaggregation in der Zwiebel [32] steht in Widerspruch zur restlichen Literatur, in der stets nur das mit Alliin (2-Propenyl-L-cysteinsulfoxid) isomere 1-Propenyl-L-cysteinsulfoxid als Inhaltsstoff von Allium cepa L. beschrieben wird. 1983 wurde von DORSCH [1] erstmals eine Schutzwirkung ethanolischer Zwiebelextrakte auf die allergeninduzierte Bronchokonstriktion bei Meerschweinchen und Menschen berichtet.

Weitere Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse [33,34]. Es gelang allerdings nicht, Wirksubstanzen zu identifizieren oder Aussagen über den Wirkungsmechanismus der verwendeten Extrakte zu machen.

Der Vollständigkeit wegen muß erwähnt werden, daß auch über Kontaktallergien auf Zwiebeln und andere Allium-Arten berichtet wurde [35,36].

I.2. Allium sativum L. und andere Allium-Arten

I.2.1. Bisher bekannte Inhaltsstoffe:

Da zwischen Allium cepa L. und den anderen Allium-Arten enge biosynthetische und chemotaxonomische Zusammenhänge bestehen, werden auch diese behandelt.

Eine Übersicht über Knoblauchinhaltsstoffe (γ -Glutamylpeptide, Enzyme, Vitamine und andere, nicht schwefelhaltige, Inhaltsstoffe) findet sich wieder bei MICHAELLES [2]. Die charakteristischen, schwefelhaltigen und nahezu alle biologisch aktiven Inhaltsstoffe, die für das Aroma der Pflanzen der Allium-Arten verantwortlich sind, werden stets enzymatisch und durch Folgereaktionen aus verschiedenen S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxiden gebildet.

Das Hauptsubstrat der Alliinase von Allium sativum L., das (+)-S-Allyl-L-cysteinsulfoxid (Alliin) wird zu Allicin, dem wenig stabilen Hauptthiosulfinat des Knoblauchs abgebaut (Abb.1). Durch Kondensation entstehen aus Allicin die 1984 von BLOCK u. Mitarb. isolierten (E,Z)-Ajoene [37]. Auch die von APITZ-CASTRO [38] und BLOCK [37] charakterisierten Vinylthiine sind Umwandlungsprodukte des Allicins. Andere Abbauewege für die zunächst aus Alliin entstehenden Intermediärprodukte sind möglich. Die Mono-, Di- und Polysulfide stellen stabile Produkte dar. Diallyldisulfid findet sich deshalb als Hauptbestandteil des durch Wasserdampfdestillation gewonnenen Knoblauchöles.

Andere Allium-Arten unterscheiden sich von Allium cepa L. und Allium sativum L. nur im mengenmäßigen Verhältnis der verschiedenen (+)-S-Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxide.

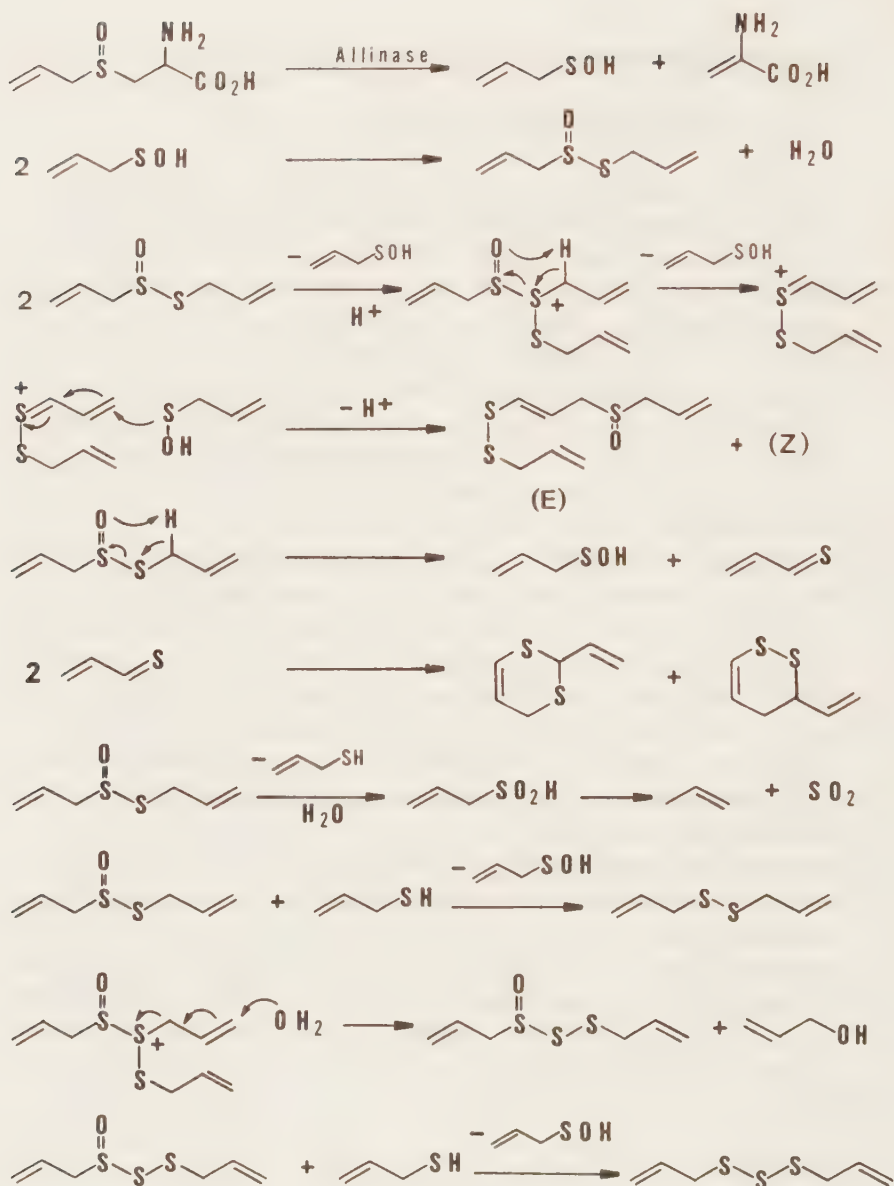


Abb. 1: Mögliche Bildungswege für schwefelhaltige Inhaltsstoffe aus Alliin nach BLOCK [37]

I.2.2. Volksmedizin und Pharmakologie

I.2.2.1. Volksmedizin und Homöopathie:

Wie Allium cepa L. wird auch Allium sativum L. seit Jahrhunderten in der Volksmedizin verwendet. Dabei reichte und reicht die Indikationsliste von Erkrankungen des Verdauungstraktes (Blähungen, Gaskoliken, Gärungsdyspepsien u.ä.) über Arteriosklerose, Hypercholesterinämie und Hypertonie bis hin zu Helminthiasis, Nematodiasis und Pilzerkrankungen der Haut [2]. Die Homöopathie empfiehlt Allium sativum L. bei Arteriosklerose, essentieller Hypertonie, Dyspepsie, Sodbrennen, Meteorismus, "gastrokardialem Symptomenkomplex" und Obstipation.

I.2.2.2. Bisherige pharmakologische Untersuchungen:

Die antibakterielle Wirkung des Allicins ist seit langem bekannt [39]. Wie bei Allium cepa L. werden auch für lipophile Extrakte aus Allium sativum L. Hemmwirkungen auf die Thrombozytenaggregation beschrieben [40]. Dabei war das Methylallyltrisulfid deutlich stärker antithrombotisch wirksam als Diallyldisulfid und Diallyltrisulfid [41]. Die Vinylldithiine [38] und Ajoene [37] zeigten ihrerseits stärkere Aktivität als sulfidische Verbindungen. Als Wirkmechanismus kann auch bei "lipophilen" Knoblauchextrakten und deren Inhaltsstoffen eine Beeinflussung des Arachidonsäurestoffwechsels angenommen werden [30]. In unserem Arbeitskreis wurde für Vinylldithiine eine mäßige, für Diallyldisulfid eine gute und für die Ajoene eine sehr gute in vitro Hemmung der Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase gefunden [42].

II. Aufgabenstellung:

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, das antiasthmatische Wirkprinzip in Allium cepa L. zu lokalisieren, die aktive(n) Substanz(en) zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären. Außerdem sollte versucht werden, analytische Verfahren zu entwickeln, die eine Standardisierung von Extrakten auf die biologisch aktiven Verbindungen ermöglichten.

Durch parallel zu den in vivo Experimenten durchzuführende in vitro Testungen sollten Erkenntnisse über den Wirkmechanismus der aktiven Komponenten gewonnen werden.

Von diesen Untersuchungen waren Auskünfte darüber zu erwarten, ob zwischen den in vitro Wirkungen und einer Asthmaschutzwirkung im Tierversuch eine Korrelation besteht. Dies war für die Auswahl von Testsystemen für das in vitro Screening von Pflanzeninhaltsstoffen von Bedeutung.

CHEMISCH-ANALYTISCHER ABSCHNITT

I. Auffindung des aktiven Prinzips

I.1. Voruntersuchungen:

Vor Beginn der Arbeit hatten DORSCH u. Mitarb. bei Untersuchungen an Meerschweinchen und zwei Patienten sowohl bei einem selbst hergestellten ethanolischen Extrakt, als auch bei frischem Zwiebelsaft und in dessen Lyophilisat eine antiasthmatische Aktivität gefunden.

Ein lyophilisierter Zwiebelsaft war mittels Säulenchromatographie an Kieselgel fraktioniert worden. Die lipophilste, mit Chloroform eluierte Fraktion hatte in vivo gute Aktivität gezeigt. Von uns durchgeführte analytische Untersuchungen dieser mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagerten Fraktion führte zur Identifizierung von Bis(2-ethylhexyl)-phthalat, einem in Kunststoffen häufig enthaltenem Weichmacher als Hauptinhaltsstoff. Daneben waren nur Spuren von Substanzen unterschiedlicher Polarität nachzuweisen. Da sich der Phthalsäureester als unwirksam erwies, mußte die Wirkung der Fraktion auf lipophilen Substanzen beruht haben, die zum Zeitpunkt der analytischen Untersuchung bereits zersetzt waren.

I.2. Extraktsscreening

I.2.1. Testmethode:

Zu Beginn der Untersuchungen standen keine in vitro Modelle zur Verfügung, um Aufschluß über eine antiasthmatische Aktivität von Extrakten in vivo zu erhalten. Das Screening der Zwiebel-extrakte und Fraktionen mußte daher mit Hilfe eines Tiermodells durchgeführt werden.

Verwendet wurde ein nichtinvasives, ganzkörperplethysmographisches System, das die Beurteilung der Lungenfunktion von Meerschweinchen während eines experimentell ausgelösten Asthmaanfalls ermöglicht.

Gemessen wurde der Parameter "compressed air", der ein empfindliches Maß für den bei der Ausatmung zu überwindenden Atemwegswiderstand darstellt.

Aufbau und Ablauf des Versuchs werden im pharmakologischen Abschnitt auf Seite 119 und im experimentellen Teil auf Seite 174 näher erläutert.

Zur Prüfung in diesem Testsystem war bei einer notwendigen Dosierung von 50-100 mg/kg und einer erforderlichen Mindesttierzahl von 2x4 (Cross over Protokoll) je Probe 400-800 mg Substanz herzustellen.

I.2.2. Untersuchte Extrakte:

Da das antiasthmatische Wirkprinzip nach den bis zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Befunden im Zwiebelsaft bzw. dessen lipophiler Fraktion lokalisiert sein mußte, haben wir verschiedene "lipophile" Extrakte hergestellt und im in vivo Testsystem untersucht.

I.2.2.1. Wasserdampfdestillat:

Eine einfache Methode zur Gewinnung des Ätherischöls von Drogen, bei der Fette und andere ubiquitäre lipophile Pflanzeninhaltsstoffe (z.B. Chlorophylle, Sterole) nicht erfaßt werden, ist die Wasserdampfdestillation. Unter diesen relativ drastischen Bedingungen werden aus Allium-Arten allerdings nur stabile Endprodukte des Abbaus der genuinen schwefelhaltigen Aminosäuren erhalten. Bei Allium cepa L. waren hauptsächlich Dimethyl- und Dipropyldisulfid zu erwarten.

Frische, geschälte und gehackte Zwiebeln wurden mit Wasserdampf destilliert, das Destillat mit Dichlormethan ausgeschüttelt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Bezogen auf das Frischgewicht der eingesetzten Droge wurde etwa 0,013% öliges Rückstand erhalten. Der Rückstand zeigte in einer Dosierung von 50 mg/kg keine signifikante antiasthmatische Wirkung.

I.2.2.2. Ohne Wärmeanwendung hergestellte Extrakte:

Mit schonenderen Extraktionsverfahren sollten auch weniger stabile Inhaltsstoffe erfaßt werden.

Zu diesem Zweck stellten wir ein

- Ether-Perkolat aus geschälten, geschnittenen und lyophilisierten Zwiebeln, ein
- Ether-Perforat aus dem Preßsaft geschälter Zwiebeln und eine
- Chloroformausschüttelung ebenfalls aus dem Preßsaft her.

Die jeweiligen Ausbeuten bezogen auf die geschälte Frischdroge betrugen 0,064%, 0,020% bzw. 0,026%. Die höhere Ausbeute bei der Perkolation im Vergleich zu den flüssig/flüssig Extraktionen erklärt sich aus der Tatsache, daß nicht alle mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Inhaltsstoffe im Zwiebelsaft vorhanden sind.

Alle drei Extrakte vermochten an Meerschweinchen in einer Dosis von 50 mg/kg die durch Inhalation des Platelet Activating Factor (PAF) induzierte Bronchokonstriktion zu antagonisieren. Für die Entscheidung, mit der Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft weiterzuarbeiten, waren letztlich praktische Erwägungen ausschlaggebend:

Die Wirksamkeit aller drei Extrakte ließ trotz der etwa 3-fachen Perkolatausbeute vermuten, daß bei der Perkolation in hohem Maße zusätzliche Begleitstoffe ohne Wirkung extrahiert worden waren.

Falls Produkte des Alliinaseabbaus Anteil an der Wirkung hatten, waren eine vorausgegangene weitgehende Gewebeerstörung und eine gewisse Reaktionszeit bei Raumtemperatur in wässrigem Milieu nötig. Unter diesem Gesichtspunkt waren Extraktionen aus Zwiebelsaft solchen aus lyophilisiertem Zwiebelgewebe vorzuziehen.

Zudem stellen sowohl die Perkolation lyophilisierter Zwiebeln als auch die Perforation des Saftes zeit- und arbeitsaufwendige Techniken dar. Da die Aufarbeitung großer Drogenmengen erforderlich war, wurde die Chloroformausschüttelung als Ausgangsmaterial verwendet.

I.3. Lokalisierung des antiasthmatischen Wirkprinzips

I.3.1. Chromatographische Charakterisierung der Chloroform-ausschüttelung aus Zwiebelsaft

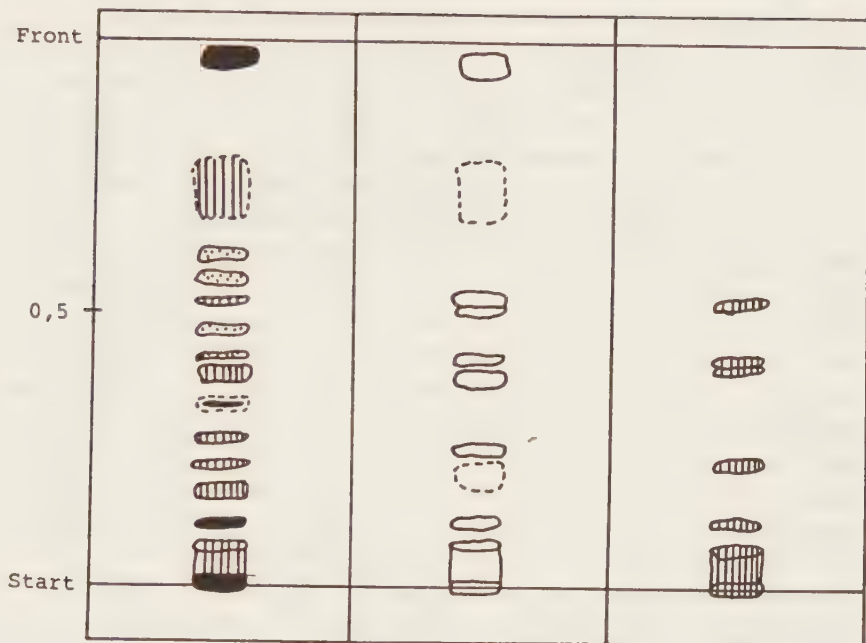
I.3.1.1. Kieselgel-Dünnschichtchromatographie:

Nach dem gewählten Extraktionsmittel war mit lipophilen Inhaltsstoffen vom Typ der Sulfide und Thiosulfinate zu rechnen. Sowohl in n-Hexan, geeignet zur Trennung von sulfidischen Verbindungen, als auch in reinem Chloroform, das in der Literatur als Laufmittel für Thiosulfinate angegeben wird, verblieb der größte Teil der mit Godins Reagens detektierbaren Inhaltsstoffe im Rf-Bereich unter 0,1. Die Verwendung hydrophilerer Trennsysteme brachte bessere Ergebnisse. 1-5% Diethylether, Ethylmethylether oder Aceton in Chloroform oder Dichlormethan sowie Trennsysteme auf der Basis von Hexan oder Toluol mit Zusatz von 10-40% Ethylacetat erwiesen sich als gut geeignet.

Im UV 254 zeigten eine Reihe von Zonen vom Start bis Rf=0,5 und an der Laufmittelfront Fluoreszenzminderung. Detektion mit Godins Reagens, einem Universalreagens für terpenoide Verbindungen, lieferte Zonen über den ganzen Rf-Bereich sowie an der Laufmittelfront und am Start. Am stärksten ausgeprägt waren mit Godins Reagens eine sich spontan rot anfärbende Zone bei Rf=0,40 sowie drei violette Zonen bei Rf=0,48, 0,58 und 0,62. Durch DC-Vergleiche mit authentischen Referenzsubstanzen ubiquitär vorkommender Pflanzeninhaltsstoffe konnte die violette Zone bei Rf=0,48 dem bereits für Allium cepa L. beschriebenen β -Sitosterin zugeordnet werden [43].

Nach der Polarität und dem Detektionsverhalten konnte es sich auch bei den Zonen bei Rf=0,58 und 0,62 um Sterole handeln. Neben β -Sitosterol sind Cycloartenol und Lophenol als Hauptvertreter dieser Stoffklasse in Allium cepa L. beschrieben [2].

LM: Tol/EtOAc (10:3)



Det.: Vanillin/ H_2SO_4

$PdCl_2$ -Lösung

Alkal. Natriumnitro-
prussidnatriumlösung



schwache Zone



blauviolett



braun



rot (verblassend)



rot



grau

Abb. 2: Dünnschichtchromatogramme der Chloroformausschüttelung;

Bei Verwendung von wässriger Palladium(II)-chlorid Lösung, einem spezifischen Detektionsmittel für schwefelhaltige Verbindungen, erhielten wir braungefärbte Zonen über den gesamten Rf-Bereich. Besonders stark angefärbt wurden Front- und Startbereich, sowie die sich mit Godins Reagens spontan rot anfärbende Zone bei $R_f=0,40$.

Da alkalische Natrium-Nitroprussidnatrium-Lösung spezifisch Verbindungen mit Sulfoxidstrukturen unter Rotfärbung detektieren soll, wurde auch dieses Reagens eingesetzt.

Wir erhielten rotgefärbte Zonen vom Startbereich bis $R_f=0,5$. Die je nach Detektionsmethode im Extrakt erkennbaren Hauptzonen waren nicht identisch. Manche Zonen, die Fluoreszenzminderung im UV 254 zeigten waren nicht oder nur schwach mit Godins Reagens detektierbar. Auch die Detektionen mit $PdCl_2$ -Lösung und Natrium-Nitroprussidnatrium-Lösung korrelierten nicht mit jener nach Godin.

Demnach waren dünnenschichtchromatographisch in der Chloroform-ausschüttelung des Zwiebelsaftes eine große Zahl von Inhaltsstoffen nachweisbar, bei denen es sich nach der UV 254 Fluoreszenzminderung und dem Detektionsverhalten um Terpene und/oder um schwefelhaltige, vermutlich $-S=O$ Strukturen enthaltende Verbindungen handeln sollte. Die Vielfalt der Inhaltsstoffe führte offensichtlich zu Zonenüberlagerungen.

I.3.1.2. Hochdruckflüssigchromatographie:

In der Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft war mit zersetzlichen Inhaltsstoffen zu rechnen. Da die Temperaturbelastung in der Gaschromatographie bei thermolabilen Substanzen zu Abbaureaktionen führen kann, setzten wir zur Charakterisierung des Extraktes die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) ein.

Eine befriedigende, wenngleich aufgrund der Komplexität des Extraktes nicht optimale Auftrennung wurde an einer "reversed-phase" Säule mit Acetonitril/Wasser Gradientenelution erreicht (von 20% MeCN in 30 min auf 80% MeCN = HPLC System 1).

Detektiert wurde bei 200 nm, um möglichst alle Inhaltsstoffe, auch solche ohne chromophore Systeme zu erfassen.

Die Hauptmenge der Extraktkomponenten (ca. 30 Hauptpeaks) wird bis zu einer Retentionszeit (R_t) von 20 min (60% Acetonitril) eluiert.

Abbildung 3 zeigt ein HPLC-Chromatogramm des Extraktes mit Zuordnung der später isolierten Verbindungen und deren on-line aufgenommenen UV-Spektren.

Bei sterolhaltigen Zwiebelextrakten ist es nötig, nach Ende der Analyse die Elutionskraft stark zu erhöhen, um die Säule von den Triterpenen zu reinigen.

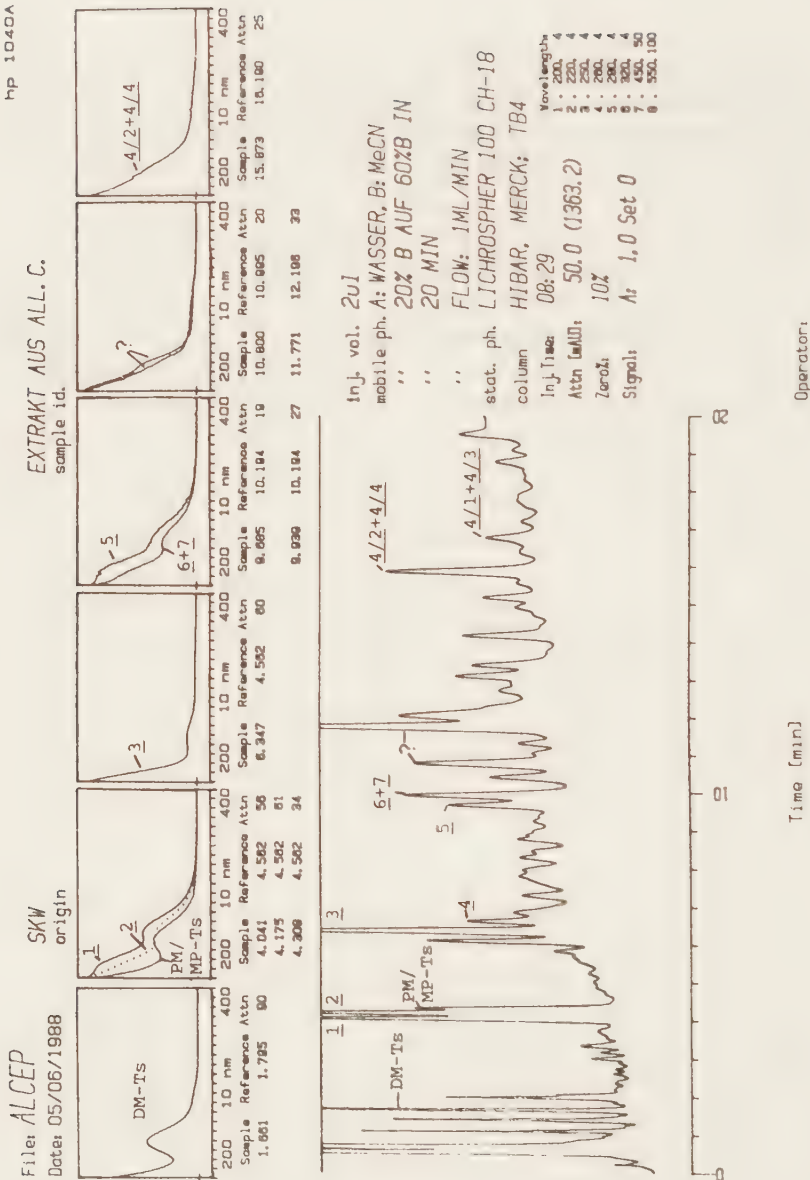


Abb. 3: HPLC-Chromatogramm der Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft (System 1) mit Zuordnung der später identifizierten Verbindungen. ?=weitere Cepaene?

I.3.2. Fraktionierung des Extraktes:

Die Extraktherstellung und -fraktionierung sowie die Isolierung der Substanzen der aktiven Fraktionen sind in Abbildung 4 zusammengefaßt.

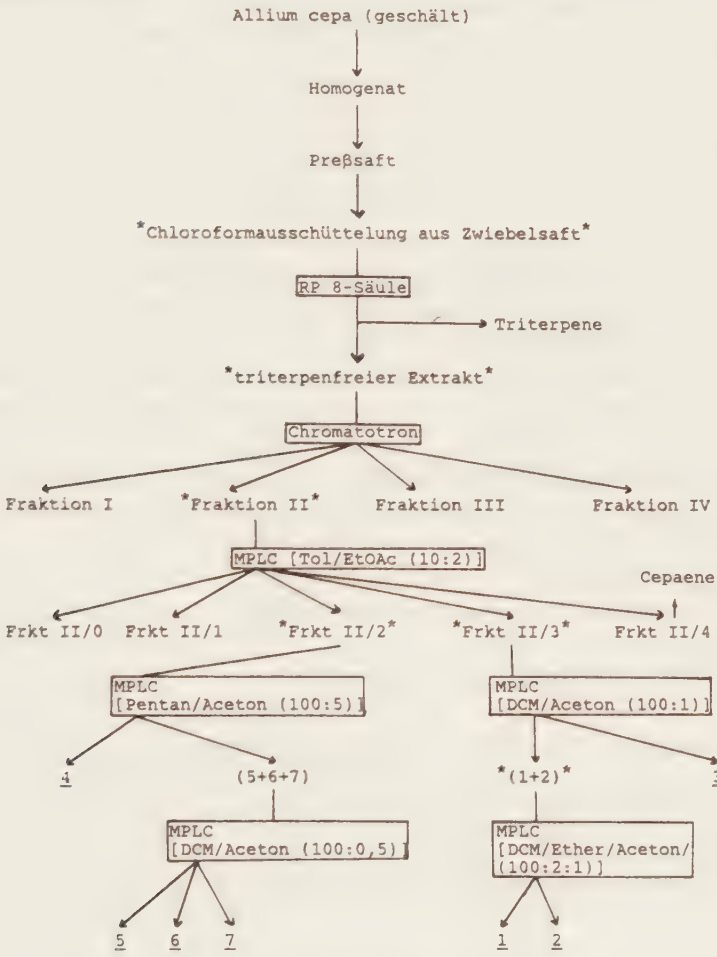


Abb. 4: Aufarbeitungs- und Isolierungsschema
* *: Fraktionen mit antiasthmatischer Wirksamkeit

I.3.2.1. Schnellfraktionierung mittels "Chromatotron":

Das seit kurzem zur Verfügung stehende Fliehkraft Chromatographiesystem "Chromatotron" * erlaubt in kurzer Zeit (30-45 min je Trennvorgang) eine Grobfraktionierung von Extrakten. Bei Verwendung einer Kieselgelschichtdicke von 2 mm wurden je Lauf 300 mg Extrakt aufgetrennt und vier Grobfraktionen gesammelt. Fraktion I (13%), eluiert mit Chloroform, bestand aus dem lipophilen Substanzgemisch, das bei der DC Trennung in Chloroform oder Toluol/Ethylacetat (10:3) an der Laufmittelfront zu finden war. Fraktion II (34%), ebenfalls mit Chloroform eluiert, war bei der DC in Toluol/Ethylacetat (10:3) über den gesamten Rf-Bereich aufgetrennt worden. Fraktion III (36%) wurde mit Chloroform/Methanol (100:10) eluiert und verblieb im obigen Trennsystem ebenso im Startbereich, wie die stark hydrophilen Komponenten der Fraktion IV (12%), die mit reinem Methanol von der Chromatotronplatte eluiert werden mußten. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Menge an eingesetztem Extrakt.

Die vier erhaltenen Grobfraktionen wurden auf Asthmaschutzwirkung getestet. Nur die Fraktion II zeigte in einer Dosis von 50 mg/kg eine deutliche Hemmwirkung.

I.3.2.2. Auftrennung von Fraktion II

I.3.2.2.1. Abtrennung unwirksamer Sterole:

Die wirksamen Inhaltsstoffe des Extrakts lagen auf Kieselgel in dem DC-Polaritätsbereich, in dem β -Sitosterin nachgewiesen worden war und noch andere Sterole vermutet wurden. Die Sterole überlagerten sich mit anderen Substanzen. Da für Sitosterin keine antiasthmatische Wirkung bekannt ist und sich die

*Eine ringförmig mit Kieselgel beschichtete, runde Glasplatte rotiert mit 750 U/m. Das zu trennende Substanzgemisch wird gelöst im Inneren des Kieselgelrings aufgetragen und mit zutropfendem Laufmittel durch Zentrifugalkraft eluiert. Fraktionierung erfolgt von Hand am Auslaß der geeigneten Apparatur.

Substanz im Tierversuch als unwirksam erwies, schien es sinnvoll, vor einer weiteren Auftrennung der Fraktion II die Triterpene zu entfernen. Ihre Abtrennung gelang durch "Flash-Chromatographie" an RP-Material.

Bei Elution des Extrakts von einer RP-Säule mit Methanol als Laufmittel erschienen die Triterpene nach längeren Retentionszeiten als die übrigen Inhaltsstoffe des Extraktes.

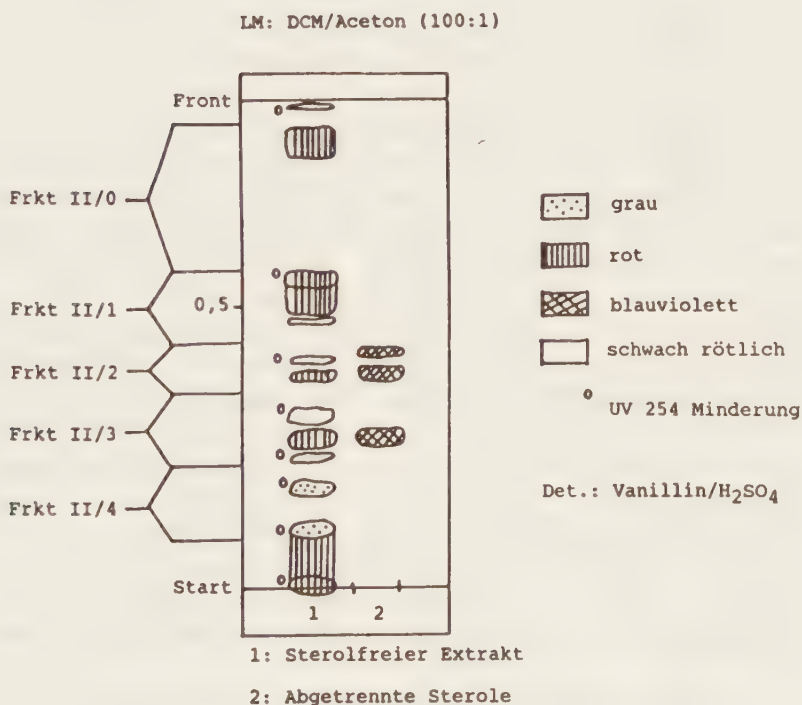


Abb. 5: DC der aus dem Extrakt abgetrennten Triterpene und des verbleibenden Extraktes [mit Definition der Unterfraktionen II/0-II/4];

Die Sterolfraction (15%) zeigte im experimentellen Meerschweinchenasthma keine Schutzwirkung während der verbleibende Extrakt in einer Dosis von ebenfalls 50 mg/kg weiterhin aktiv war.

I.3.2.2.2. Säulenchromatographische Auftrennung der Fraktion II:

Das Dünnschichtchromatogramm des sterolfreien Extraktes zeigte im Polaritätsbereich der Fraktion II nach Detektion mit Godins Reagens fünf Substanzen/Substanzgruppen (s. Abbildung 5). Die Zonen reagierten mit Godins Reagens schwach rosa bis rot und ergaben mit PdCl_2 -Lösung schwache bis deutliche Braunfärbungen. Es war demnach mit dem Vorliegen schwefelhaltiger Verbindungen zu rechnen.

Die Anreicherung der Substanzen/Substanzgruppen mußte rasch erfolgen, um durch eine zu lange Verweildauer der Komponenten auf der Kieselgelsäule mögliche Abbaureaktionen zu verhindern. Die Methode der Wahl war die Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) mit Glassäulen an Kieselgel. Die MPLC ermöglicht Auftrennung von mittleren Substanzmengen (2-3 g in 5 ml Lösung) in kurzer Zeit. Bei Flußraten von 10-15 ml/min (10-30 bar Gegendruck) nimmt eine Trennung je nach Säulenvolumen und Rf-Wert der Komponenten im Elutionsmittel ein bis acht Stunden in Anspruch. Die Trennschärfe ist durch dichtere Packung des Säulenmaterials größer als bei der Säulenchromatographie unter Normaldruck.

Die Auftrennung der Fraktion II erfolgte aus dem sterolfreien Extrakt im Fließmittel Toluol/Ethylacetat (10:2). Aus je 2 g Extrakt wurden so 110 mg (5,5%) II/0, 93 mg (4,6%) II/1, 40 mg (2%) II/2, 110 mg (5,5%) II/3 und 85 mg (4,3%) II/4 erhalten.

Von den fünf aus Fraktion II gewonnenen Unterfraktionen verminderten lediglich Fraktion II/2 und Fraktion II/3 (30 mg/kg) signifikant die PAF-induzierte Bronchokonstriktion bei Meerschweinchen.

In der analytischen HPLC zeigten beide aktive Unterfraktionen je drei Peaks, die mit 1-6 bezeichnet wurden.

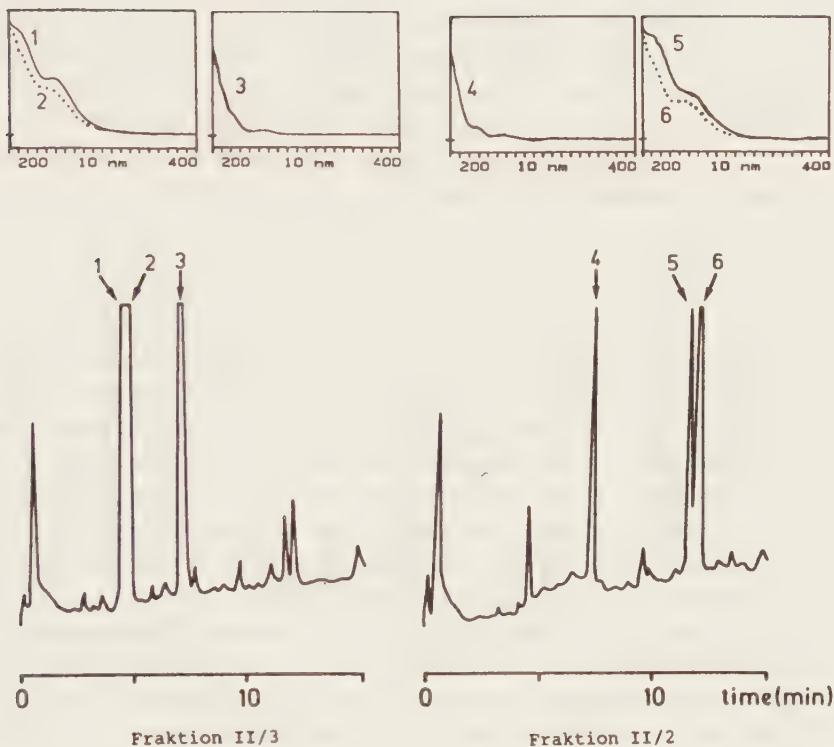


Abb. 6: HPLC-Chromatogramme der wirksamen Unterfraktionen II/2 und II/3 mit on-line aufgenommenen UV-Spektren (HPLC-System 1);

Die UV-Spektren der Peaks 1, 2, 5 und 6 zeigten Maxima bei etwa 250 nm.

Die Spektren der Peaks 3 und 4 waren mit einem schwachen Absorptionsmaximum bei 230 nm und einem sehr schwachen Maximum bei 255 nm identisch.

Auf der DC gelang im Laufmittel Chloroform/Aceton (100:4) die Auftrennung beider Fraktionen in je eine die UV 254-Fluoreszenz mindernde und eine nicht mindernde Zone. In der "mindernden" Zone der Fraktion II/2 überlagerten sich offensichtlich die

Peaks 5 und 6, in der der Fraktion II/3 die Peaks 1 und 2. Nach ihrem Detektionsverhalten auf DC und den on-line aufgenommenen UV-Spektren ließen sich die sechs Komponenten der aktiven Fraktionen II/2 und II/3 in zwei Substanzgruppen unterteilen. Gruppe 1: Substanzen 1 und 2 aus Fraktion II/3 und Substanzen 5 und 6 aus Fraktion II/2. Gruppe 2: Substanz 3 aus Fraktion II/3 und Substanz 4 aus Fraktion II/2.

I.3.2.3. Anreicherung der Komponenten der Fraktion II/3:

Die Komponenten der Fraktion II/3 wurden in höherer Ausbeute erhalten als jene von Fraktion II/2 (5,5% : 2%). Daher reicherten wir Substanz 3 und die Mischung der Substanzen 1 und 2 zur Testung an. Die Anreicherung erfolgte aus dem sterolfreien Extrakt durch MPLC an Kieselgel mit Dichlormethan/Aceton (100:1) als Laufmittel. Aus je 3 g Extrakt wurden etwa 75 mg 1+2 (2,5%) und 96 mg 3 (3,2%) erhalten. Die erhaltenen Proben wiesen einen Reinheitsgrad von etwa 80 % auf.

In einer Dosis von jeweils 20 mg/kg erwies sich die Mischung der Substanzen 1 und 2 als sehr aktiv, während Substanz 3 keine Wirksamkeit zeigte (s. Abb. 46, Seite 123).

Damit war das aktive Prinzip der Fraktion II/3 lokalisiert. Die Inhaltsstoffe der ebenfalls wirksamen Fraktion II/2 sollten den Komponenten von Fraktion II/3 verwandt sein.

I.4. Isolierung der Inhaltsstoffe der Fraktionen II/2 und II/3

I.4.1. Substanzen der Fraktion II/3

I.4.1.1. Verbindung 3:

Durch einen weiteren Reinigungsschritt (MPLC) erhielten wir aus 50 mg einer mit Substanz 3 angereicherten Fraktion 30 mg Substanz 3 in reiner Form. Die Substanz kristallisierte unter Eiskühlung und war geruchlos.

I.4.1.2. Verbindungen 1 und 2:

Die Substanzen 1 und 2 konnten selbst auf HPTLC-Platten in verschiedensten Trennsystemen nur unvollkommen in zwei Zonen aufgetrennt werden. Beide Substanzen sollten daher durch präparative HPLC in reiner Form dargestellt werden. Bei isokratischer Elution mit 18% Acetonitril in Wasser als Laufmittel wurde auf der analytischen RP-HPLC-Säule Grundlinientrennung erreicht. Das System war auf eine semipräparative Säule übertragbar. Nach Ausschütteln der entsprechenden Acetonitril/Wasser Fraktionen mit Chloroform, Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen der Acetonitril/Chloroform Mischung unter vermindertem Druck zeigte die analytische HPLC- Untersuchung der erhaltenen Produkte, daß bereits eine Zersetzung begonnen hatte. Auch mittels DC waren Abbauprodukte nachweisbar. Die zur Entfernung des Acetonitrils nötige Temperatur von ca. 45°C hatte vermutlich zu Abbaureaktionen geführt. Auf Kieselgel war in Dichlormethan/Diethylether/Aceton (100:2:1) eine geringfügige Auftrennung beider Substanzen gelungen. Mit diesem Laufmittel wurde durch MPLC (Säule 1) eine Anreicherung beider Substanzen erhalten. Es handelt sich um farblose viskose Öle von stechendem, charakteristischem Zwiebelgeruch. Unmittelbar danach wurden HPLC-Chromatogramme der angereicherten Substanzen 1 und 2 aufgenommen (Abb. 7).

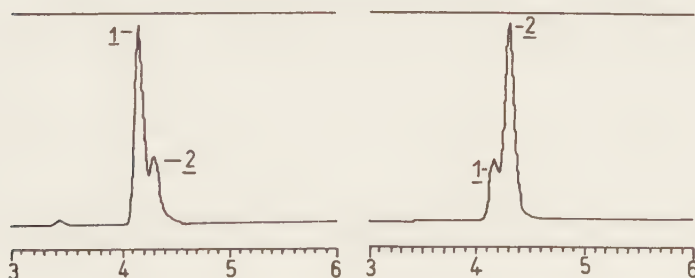
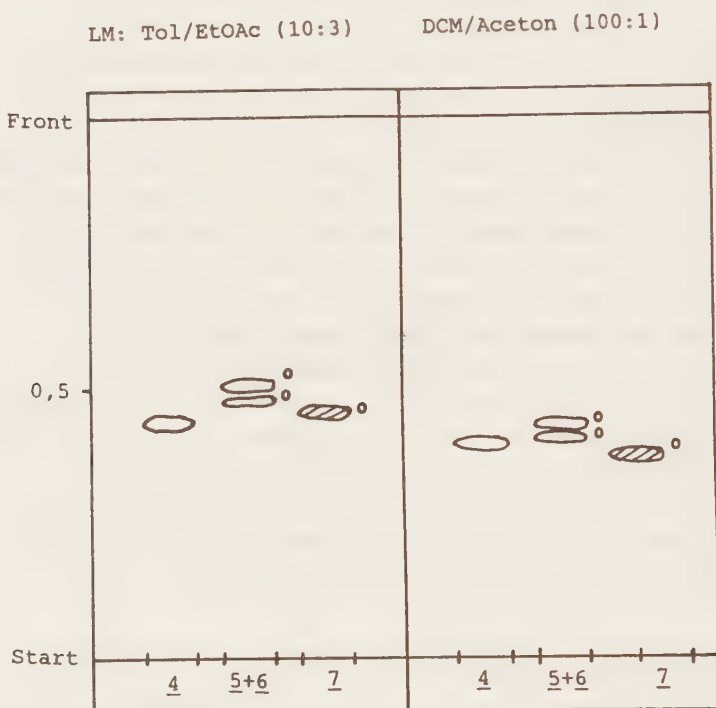


Abb. 7: HPLC-Chromatogramme der durch MPLC angereicherten Verbindungen 1 und 2 (HPLC-System 1);

I.4.2. Substanzen der Fraktion II/2:

In einer Reihe von MPLC Läufen mit n-Pentan/Aceton (100:5), Chloroform/Aceton (100:2) und Dichlormethan/Aceton (100:0,5) als Laufmittel konnten aus Fraktion II/2 die in Abbildung gezeigten Proben erhalten werden:



Det.: PdCl_2 -Lösung

braun

 gelb
 ° UV 254 Minderung

Abb. 8: Dünnschichtchromatogramme der aus Fraktion II/2 gewonnenen Proben.

Die Fraktion II/2 bestand demnach nicht aus drei Komponenten, wie das HPLC-Chromatogramm zunächst zeigte, sondern aus vier Substanzen. Dabei verhielt sich Substanz 4 bei der Detektion analog zu Verbindung 3. Die Verbindungen 5 und 6 reagierten wie die Substanzen 1 und 2. Verbindung 7 ergab mit PdCl_2 -Lösung eine Gelb- statt Braunfärbung und reagierte nur sehr schwach mit Godins Reagens.

Die HPLC-Chromatogramme obiger Proben erlaubten die Zuordnung der DC-Zonen zu den HPLC-Peaks. Der zweite Peak der Probe (5 + 6) war retentionsgleich mit dem Peak der Substanz 7. Beim Überspritzen der Proben fielen beide Peaks zusammen.

Es verblieb das Problem der Trennung der Verbindungen 5 und 6. Die Trennung sei als Beispiel für die Leistungsfähigkeit der MPLC an Kieselgel ausführlicher behandelt:

Voraussetzung für die Bewältigung schwieriger Trennprobleme ist bei jeder säulenchromatographischen Technik ein ausreichend niedriger R_f -Wert der Komponenten (bei erkennbarer Auftrennung auf HPTLC-Platten) in dem verwendeten Laufmittel. Als vertretbarer Kompromiß zwischen Trennschärfe und Dauer des Trennvorgangs bzw. Substanzverdünnung erwiesen sich R_f -Werte zwischen 0,1 und 0,2.

Zur Trennung von 5 und 6 wurde Säule 1, Kieselgel 60 und Dichlormethan/Aceton (100:0,5) als Eluens verwendet. Bei einem Flow von 10 ml/min wurden Fraktionen zu 20 ml gesammelt. Aus 25 mg Gemisch konnten in den Fraktionen 33-36 4 mg Substanz 6 und in den Fraktionen 39-43 5 mg Substanz 5 erhalten werden. Sofort nach der Isolierung aufgenommene HPLC-Chromatogramme zeigten nur etwa 10% Verunreinigung mit der jeweils anderen Komponente.

Die Verbindungen 5, 6 und 7 sind farblose Öle. 5 und 6 weisen einen charakteristischen Zwiebelgeruch auf. 7 riecht stechend und unangenehm. Die Verbindungen 3 und 4 liegen bei Raumtemperatur an der Phasengrenze fest/flüssig vor und sind geruchlos.

II. Strukturaufklärung der aus den aktiven Fraktionen isolierten Verbindungen

II.1. Verbindungen 1 und 2

II.1.1. Voruntersuchungen:

Die Substanzen 1 und 2 zeigten bei der DC auf Kieselgel und in der RP-HPLC im Laufverhalten nur sehr geringe Unterschiede. Beide verursachten Fluoreszenzminderung im UV 254, zeigten keine Eigenfluoreszenz im UV 365, reagierten mit Godins Reagens schwach graublau, mit PdCl_2 -Lösung deutlich braun und mit Natrium-Nitroprussidnatrium-Lösung zu verblassender Rotfärbung. Es waren somit schwefelhaltige Moleküle mit einer Sulfoxidstruktur zu vermuten. Die on-line aufgenommenen UV-Spektren zeigten durch eine Schulter bei 250 nm einen nichtaromatischen Chromophor an. Eine S/O-Analyse der Mischung beider Komponenten bestätigte Sauerstoff- und Schwefelgehalt der Substanzen.

II.1.2. Massenspektroskopie:

In EI-Massenspektren konnte kein Molekülpeak erhalten werden. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde daher die Massenspektroskopie mit chemischer Ionisation (CI-MS) herangezogen. Die chemische Ionisation stellt eine schonende Ionisierungsmethode dar, bei der die Fragmentierung der Molekülionen unterdrückt werden kann. Im Gegensatz zur Elektronenstoßionisation (EI-MS) erscheint daher auch bei wenig stabilen Substanzen ein Molekülpeak (vgl. Abbildung 23). Der Molekülpeak ($[\text{M}+\text{H}]^+$) wird bei Verwendung von Ammoniak als Reaktandgas i.d.R. von einem $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Peak begleitet. Zur Technik der chemischen Ionisation in der Massenspektroskopie siehe Literatur [44].

Die Mischung der Substanzen 1 und 2 zeigte einen $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Peak bei m/e 137 sowie einen $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -Peak bei m/e 154. Beide Komponenten besitzen damit ein Molekulargewicht von 136. Die Massenpeaks der Molekülionen wurden von Isotopenpeaks des Schwefelisotops ^{34}S (Häufigkeit 4%) begleitet.

Die Isotopenpeaks zeigten jeweils 8% der Intensität des entsprechenden Molekülpeaks. Im Molekül sollten demnach zwei Schwefelatome enthalten sein.

Die bei m/e 273 ($[2M+H]^+$) und m/e 290 ($[2M+NH_4]^+$) auftretenden Peaks wiesen auf eine Dimerisierung der Substanzen hin. Auch diese Peaks waren von entsprechenden ^{34}S -Peaks begleitet. Zusammengefaßt folgt aus dem chromatographischem Verhalten, der S/O-Analyse, dem identischen Molekulargewicht und den ^{34}S -Isotopenpeaks, daß 1 und 2 isomere Verbindungen der Summenformel $C_4H_8OS_2$ sind.

II.1.3. NMR-Spektroskopie

II.1.3.1. 80 MHz 1H -NMR-Spektren:

Die 80 MHz 1H -NMR-Spektren beider angereicherter Substanzen 1 und 2 (siehe III.4.1.2.) waren überraschenderweise identisch. Sie zeigten beide ein "Triplet" bei 1,9 ppm, ein "Dublett" bei 3,0 ppm und ein "Multiplet" bei etwa 6,4 ppm. Die HPLC-Analyse der Proben nach Aufnahme der Spektren zeigte, daß beide Komponenten jeweils etwa im Verhältnis 1:1 vorlagen. Die Verbindungen hatten sich während der Lagerung bei Raumtemperatur vor der Messung ineinander umgewandelt. Dies sprach wiederum für isomere Verbindungen.

II.1.3.2. 360 MHz 1H - und 90 MHz ^{13}C -NMR-Spektren:

Beide Komponenten wurden erneut durch MPLC angereichert und sofort vermessen. Abbildung 9 zeigt das Protonen-NMR-Spektrum von Substanz 2. Ein Vergleich des Spektrums von Substanz 2 mit dem der angereicherten Substanz 1 ermöglicht die Zuordnung der Signale beider Komponenten (Tab. 1).

Verbindung <u>1</u>	Verbindung <u>2</u>
1,93 (d; 5,5 Hz; 3H)	1,87 (dd; 6,9/1,6 Hz; 3H)
2,97 (s; 3H)	3,03 (s; 3H)
6,38 (m*; 2H)	6,33 (qd; 5,5/8,9 Hz; 1H)
	6,46 (qd; 1,6/8,9 Hz; 1H)

*System höherer Ordnung

Tab. 1: ^1H -Resonanzen von 1 und 2 (δ in ppm; Multiplizität; J; Integration) bei 360 MHz;

Beide Substanzen enthalten eine mäßig entschirmte Methylgruppe (1,93/1,87 ppm), deren Dublettaufspaltung einen Kopplungspartner anzeigt und eine durch elektronegative Substitution stark entschirmte Methylgruppe (2,97/3,03 ppm) ohne Kopplungspartner.

In beiden Molekülen liegen je zwei olefinische Protonen vor. Diese erscheinen in 2 als A/B-System (6,33 und 6,46 ppm). In 1 überlagern sich die Signale beider olefinischer Protonen bei 360 MHz zu einem System höherer Ordnung um 6,38 ppm (s. Abb. 9).

Die Entschirmung der Doppelbindungsprotonen zeigt eine elektronegative Substitution des Systems an.

Für beide Verbindungen sind damit folgende Strukturteile bewiesen:

- 1) $\text{CH}_3\text{-X-}$ 2) $\text{CH}_3\text{-CH=CH-X-}$

Daraus ergibt sich der vorliegende Strukturtyp:



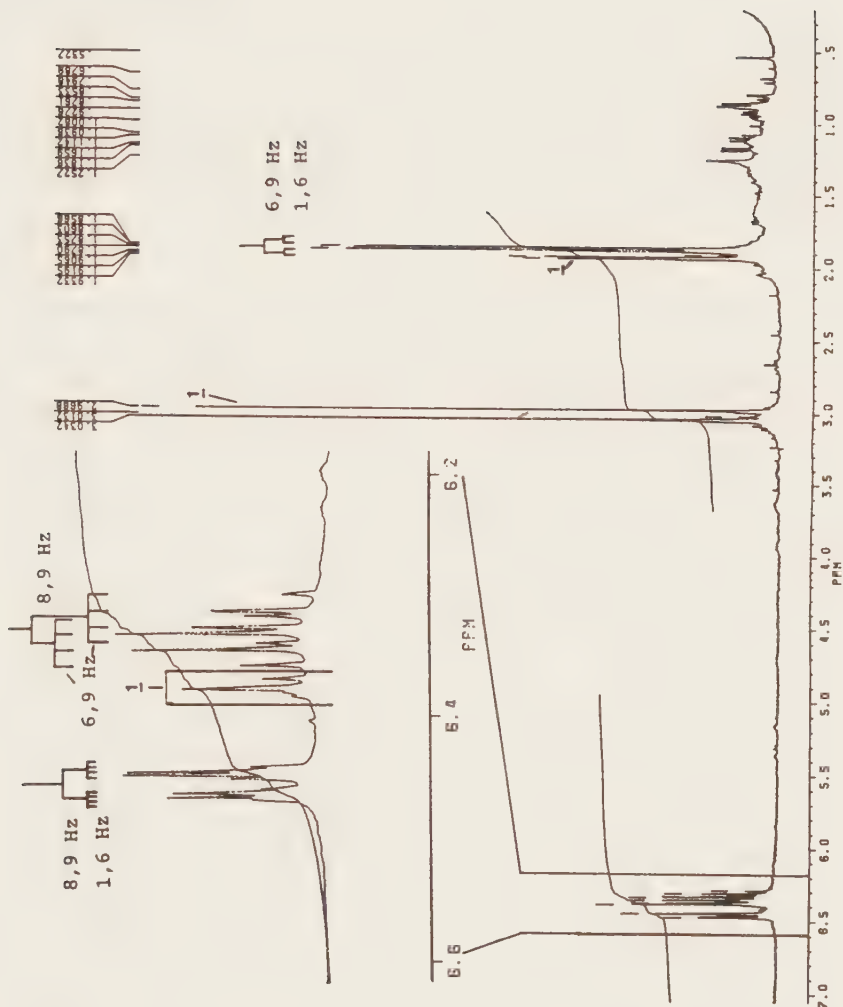


Abb. 9: ^1H -NMR-Spektrum der angereicherten Substanz 2 (360 MHz; CDCl_3 ; TMS) mit Zuordnung der Signale der "Verunreinigung" Substanz 1

Die Doppelbindung ist in 2 cis-konfiguriert ($J=8,9$ Hz), bestimmt durch Entkopplung der Methylgruppe bei 1,87 ppm. Für eine cis-Konfiguration spricht auch die long range Kopplung von 1,6 Hz zwischen der Methylgruppe (1,87 ppm) und den Signalen des Protons bei 6,46 ppm.

Die long range Kopplung zwischen olefinischem Proton und trans-Methylgruppe beträgt meist über 1 Hz. Zwischen Proton und cis-ständiger Methylgruppe sind die long range Kopplungen sehr viel kleiner oder treten nicht in Erscheinung.

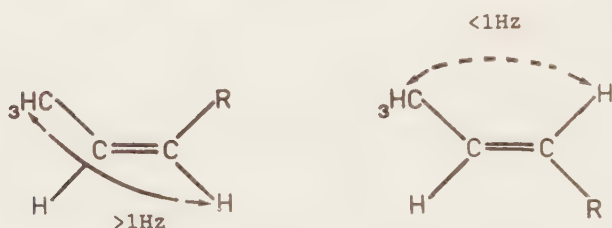


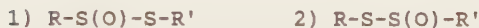
Abb. 10: Zu erwartende long range Kopplungen von olefinischen Protonen mit einer cis/trans-ständigen Methylgruppe

Das System höherer Ordnung beider olefinischer Protonen der Verbindung 1 bei 6,38 ppm bleibt auch bei einer Feldstärke von 500 MHz erhalten, sodaß die Kopplungskonstanten der Protonen und damit die Konfiguration der Doppelbindung daraus nicht zu entnehmen sind. Allerdings erscheint das Methyldublett bei 1,93 ppm nur als leicht verbreitertes Signal ohne erkennbare Aufspaltung durch eine long range Kopplung. Dies muß als Hinweis auf eine cis-Anordnung von Proton und Methylgruppe und damit eine trans-Doppelbindung in 1 verstanden werden. Damit kann angenommen werden, daß sich 1 und 2 in der Konfiguration der Doppelbindung unterscheiden.

Nach der Summenformel besteht die Heterobrücke "X" aus einem Sauerstoff- und zwei Schwefelatomen, stellt also eine Thiosulfinatfunktion dar:



Bei asymmetrisch substituierten Thiosulfinsäureestern existieren zwei Stellungsisomere:



Nachdem 1 und 2 isomere Verbindungen waren, blieb zu klären, ob lediglich cis/trans-Isomerie an der Doppelbindung oder stattdessen Stellungsisomerie des Sauerstoffatoms der Thiosulfinatfunktion oder evtl. beide Erscheinungen vorlagen.

Da aus dem ^1H -NMR-Spektrum von 1 die Kopplungskonstante der olefinischen Protonen nicht zu entnehmen war und das Auftreten bzw. Fehlen einer long range Kopplung zwischen Methylgruppe und olefinischem Proton kein völlig schlüssiger Beweis für cis/trans-Isomerie darstellt, war diese zwar wahrscheinlich, aber nicht 100%-ig gesichert.

Für das Vorliegen von Stellungsisomeren sprachen folgende Argumente:

- Die von uns synthetisierten Isomere Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat unterscheiden sich chromatographisch analog 1 und 2 (s.u.).
- Aufgrund der Tatsache, daß 1 und 2 aus Methyl- und 1-Propenylsulfensäure gebildet werden, ist das Vorhandensein sowohl von Methyl-1-propenyl- als auch von 1-Propenylmethylthiosulfinat zu erwarten.

Im Falle einer Stellungsisomerie des Sauerstoffs an der Thiosulfinatfunktion war mit deutlichen Unterschieden der chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -Atome zumindest der Methylgruppen beider Verbindungen zu rechnen:

Für die Protonen in Dimethylthiosulfinat wird in der Literatur bei Messung in Tetrachlorkohlenstoff eine chemische Verschiebung von 2,92 ppm (α -Methyl) und 2,52 ppm (α' -Methyl)

angegeben [45]. Eigene Messung an synthetischem Dimethylthio-sulfinat in Chloroform ergab 3,00 bzw. 2,67 ppm. Die ^{13}C -Verschiebungen werden zu 41,7/43,7 ppm [46] bzw. 41,9/44,4 ppm [47] für $\text{C}_\alpha/\text{C}_\beta$ angegeben.

Phenylsubstitution zu zwei asymmetrisch substituierten Methylphenylthiosulfinsulfonaten beeinflusst die Resonanzen der Methylprotonen nur wenig:

α -Methyl: 2,90 ppm; α' -Methyl: 2,53 ppm [48].

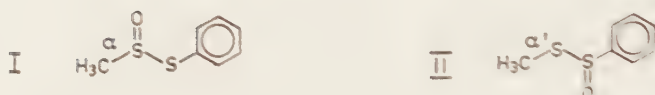


Abb. 11: Methylthiosulfinsäure-S-phenylester (I) und Phenylthiosulfinsäure-S-methylester (II)

Die Protonen der Methylgruppen von 1 und 2 gehen bei 2,97 und 3,03 ppm, die entsprechenden ^{13}C -Kerne bei 42,2 und 42,7 ppm in Resonanz (s. Tab. 2).

Kernsorte	Verbindung <u>1</u>	Verbindung <u>2</u>
$\text{CH}_3\text{-CH=}$	15,2	19,0
$\text{CH}_3\text{-S(O)}$	42,2	42,7
-S-CH=	137,5	144,3
$\text{CH}_3\text{-CH=}$	116,9	115,7

Tab. 2: ^{13}C -NMR-Daten der Verbindungen 1 und 2 bei 90 MHz (δ in ppm);

Diese Daten sprechen gegen eine Stellungsisomerie der Thiosulfatfunktion und legen zusammen mit den Argumenten für cis/trans-Isomerie folgende Strukturen für 1 und 2 nahe:

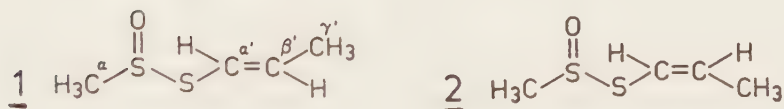


Abb. 12:

Dieser Strukturvorschlag konnte durch die NMR-Daten der 1-Propenylgruppen in 1 und 2 erhärtet werden, nachdem bisher keine spektroskopischen Daten α,β -ungesättigter Thiosulfinate in der Literatur beschrieben sind:

Die α' -Kohlenstoffresonanzen beider Substanzen sind um 6,8 ppm, die γ' -Kohlenstoffresonanzen um 3,8 ppm verschieden. Die Resonanzlagen der γ' -Protonen differieren um 0,06 ppm. Beide Verbindungen unterscheiden sich also in den NMR-Daten der 1-Propenylgruppe stärker als in den Daten der α -Methylgruppe, was wiederum für cis/trans-Isomerie der Doppelbindung spricht. $C_{\alpha'}$ wird in Thiosulfaten deutlich stärker entschirmt als $C_{\beta'}$ (z.B.: $\Delta=13,7$ ppm für Di-*i*-propylthiosulfat [47]). Dieser Unterschied ist in 1 und 2 mit 27,4 und 26,8 ppm stärker ausgeprägt.

Auch die leichte Isomerisierung der Substanzen (s.o.) spricht eher für cis/trans- als für Stellungsisomere. Cis/trans-Isomerisierungen bei Raumtemperatur werden in der Literatur beschrieben [49]. Gegenseitige Umwandlung von Stellungsisomeren setzt entweder Sauerstoffwanderung oder Bindungsbruch und Rekombination des Moleküls voraus. Die letztere Möglichkeit der Isomerisierung asymmetrisch substituierter Thiosulfate ist nicht beschrieben. Die von KOZUKA u. Mitarb. [50] für asymmetrisch substituierte aromatische Thiosulfate geforderte

intramolekulare Sauerstoffwanderung bei der Fragmentierung im Massenspektrometer wurde von BLOCK [51] zumindest für aliphatisch substituierte Thiosulfinate ausgeschlossen. Damit sind die in Abbildung 12 vorgeschlagenen Strukturen bewiesen:

1 ist demnach Methylthiosulfinsäure-S-trans-1-propenylester und

2 stellt Methylthiosulfinsäure-S-cis-1-propenylester dar

Beide Verbindungen sind bisher weder aus Pflanzen isoliert noch synthetisiert worden.

II.2. Verbindung 7

II.2.1. Voruntersuchungen:

Die Substanz zeigte bei der DC-Auftrennung in allen Laufmittelsystemen höhere R_f-Werte als 1 und 2, sowie Fluoreszenzmin- derung im UV 254. Detektion mit Godins Reagens ergab sehr schwache Grau-, mit PdCl₂-Lösung Gelb- und mit Natrium- Nitroprussidnatrium-Lösung Rotfärbung.

Das on-line aufgenommene UV-Spektrum der Substanz (R_t=9,95 min, System 1) zeigte ein Absorptionsmaximum bei 240 nm und damit einen nicht aromatischen Chromophor an.

Somit konnte es sich bei Substanz 7 ebenfalls um ein Thiosul- finat handeln.

II.2.2. Massenspektroskopie:

Die CI- und EI-Massenspektren zeigten ein Molekulargewicht von 166 an. Die Molekülpeaks waren jeweils von ³⁴S-Isotopenpeaks der Intensität 8% der Molekülpeaks begleitet, was für die Anwesenheit von zwei Schwefelatomen im Molekül sprach.

Der Basispeak im EI-MS bei m/e 43 konnte von der Abspaltung einer Propylgruppe stammen. Ein prominenter Peak bei m/e 124 sprach für die Abspaltung einer $C_3H_7-S(O)-SH]^+$ -Gruppierung. Die Daten der Massenspektren waren in Einklang mit der Struktur des Dipropylthiosulfinates.

II.2.3. NMR-Spektroskopie:

Ein 360 MHz 1H -NMR-Spektrum und ein 90 MHz ^{13}C -NMR-Spektrum lieferten die in Tabelle 3 aufgelisteten Signale:

1H -NMR Daten	^{13}C -NMR Resonanzen
1,045; t; 7,1; 3H	13,16 (2C) [$C_\gamma/C_{\gamma'}$]
1,095; t; 7,1; 3H	17,17 [C_β]
1,83; m; überlagert;*	24,25 [$C_{\beta'}$]
1,89; m; überlagert;*	34,87 [$C_{\alpha'}$]
3,08; m; überlagert;+	57,98 [C_α]
3,13; m; überlagert;+	

*,+ zusammen jeweils 4H

Tab. 3: 1H -NMR Daten von 7 (δ in ppm; Multiplizität; J in Herz; Integration) und ^{13}C -NMR Resonanzen (δ in ppm) von 7 bei 360 bzw. 90 MHz

Die 1H - und ^{13}C -NMR Daten der Verbindung stehen in Einklang mit den entsprechenden Werten, die von TAKATA u. Mitarb. [48] für die beiden Isomere Phenylpropyl- und Propylphenylthiosulfinat angegeben werden. Die für Dipropylthiosulfinat angegebenen ^{13}C -Verschiebungen (Druckfehler: 24,9 statt 34,9 ppm für $C_{\alpha'}$) sind mit obigen Daten kongruent. Somit ist Verbindung 7 als Dipropylthiosulfinat identifiziert. Cochromatographie der Substanz mit von uns synthetisiertem, authentischen Dipropylthiosulfinat ergab keine Abweichung.

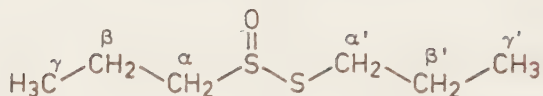


Abb. 13: Verbindung 7: n-Propylthiosulfinsäure-S-n-propylester

II.3. Verbindungen 5 und 6

II.3.1. Voruntersuchungen:

Beide Substanzen sind bei der DC-Auftrennung in ihrer Polarität der Verbindung 7 ähnlich. Dagegen entsprechen sie hinsichtlich ihres Detektionsverhalten mit Godins Reagens, Palladium(II)-chlorid Lösung und Natrium-Nitroprussidnatrium Lösung den Verbindungen 1 und 2. Die on-line aufgenommenen UV-Spektren (Rt=9,65 bzw. 9,95 min im System 1) waren mit Schultern bei 250 bzw. 245 nm ebenfalls den Spektren von 1 und 2 ähnlich. Sowohl bei der DC auf Kieselgel als auch bei der RP-HPLC verhielten sich die Verbindungen 5 und 6 lipophiler als 1 und 2. Es konnte sich demnach bei diesen Substanzen um evtl. ungesättigte, längerkettige Thiosulfinate handeln.

II.3.2. Massenspektroskopie:

EI- und CI-Massenspektren der Mischung beider Substanzen zeigten nur einen Molekülpeak bei $m/e=164$ bzw. einen $[M+H]^+$ -Peak bei $m/e=165$. Diese Peaks waren von ^{34}S -Isotopenpeaks begleitet, die zwei Schwefelatome im Molekül anzeigten.

Das ähnliche chromatographische Verhalten beider Substanzen zu Dipropylthiosulfinat, das Vorhandensein von zwei Schwefelatomen im Molekül und das um zwei Masseneinheiten geringere Molekulargewicht der Verbindungen verglichen mit Dipropylthiosulfinat legte das Vorliegen von isomeren, einfach ungesättigten Thiosulfinsäureestern der Summenformel $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{OS}_2$ nahe.

II.3.3. NMR-Spektroskopie:

Die NMR-Daten beider Isomere wurden aus Spektren der Mischung oder angereicherten Proben eines Isomeres entnommen. Wie die Verbindungen 1 und 2 isomerisierten auch 5 und 6 bei Raumtemperatur. Abbildung 14 zeigt die HPLC-Chromatogramme einer angereicherten Probe von Verbindung 5 vor und nach der Aufnahme eines ^{13}C -NMR-Spektrums (in CDCl_3 ; Meßzeit 2h).

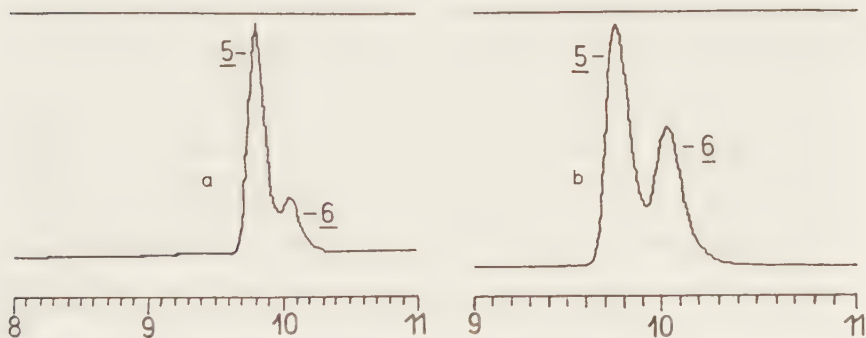


Abb. 14: HPLC-Chromatogramme (Ausschnitt) einer angereicherten Probe von 5; a) vor und b) nach zwei Stunden in CDCl_3 bei Raumtemperatur (System 1)

In Tabelle 4 sind die ^1H -NMR-Daten der Substanzen 5 und 6, in Tabelle 5 die ^{13}C -NMR-Daten zusammengefaßt:

Verbindung <u>5</u>	Verbindung <u>6</u>	Zuordnung
1,11 (t; 7,3 Hz; 3H)	1,09 (t; 7,4 Hz; 3H)	H_γ
1,85 (m; *; 2H)	1,85 (m; *; 2H)	H_β
3,12 (m; *; 2H)	3,12 (m; *; 2H)	H_α
1,86 (q/d; 1,5/6,8 Hz; 2H)	1,92 (d; 5 Hz; 3H)	$\text{H}_{\gamma'}$
6,29 (q/d; 6,8/8,9 Hz; 1H)	6,36 (+; 2H)	$\text{H}_{\beta'}/\text{H}_{\alpha'}$
6,44 (q/d; 1,5/8,9 Hz; 1H)		$\text{H}_{\alpha'}$

* Die Methylenprotonen sind magnetisch nicht äquivalent. Ihre Kopplungen und die Überlagerung der Signale beider Komponenten lassen die Signale als Multiplletts erscheinen, sodaß die Kopplungskonstanten nicht entnommen werden können.

+ System höherer Ordnung.

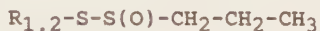
Tab. 4: ^1H -Resonanzen der Verbindungen 5 und 6 (δ in ppm; Multiplizität; J; Integration) bei 360 MHz

Zuordnung	C_γ	C_β	$\text{C}_{\gamma'}$	C_α	$\text{C}_{\beta'}$	$\text{C}_{\alpha'}$
Verbindung <u>5</u>	13,2	17,2	19,0	57,5	115,9	143,4
Verbindung <u>6</u>	13,2	17,2	15,7	58,0	117,2	136,6

Tab. 5: ^{13}C -Resonanzen der Verbindungen 5 und 6 (δ in ppm) bei 90 MHz;

In beiden Protonenspektren finden sich Signale, die von einer zur Thiosulfinatfunktion benachbarten n-Propylgruppe stammen konnten. Die entsprechenden ^{13}C -Signale (13,2/17,2/57,5 ppm in 5 und 13,2/17,2/58,0 ppm in 6) sind in Übereinstimmung mit den Signalen der α - (58,0 ppm), β - (17,2 ppm) und γ - (13,2 ppm) -C-Atome im Dipropylthiosulfinat (vgl. Verbindung 7).

Damit ist die Teilstruktur



für die Substanzen 5 und 6 bewiesen.

Die Substanzen müssen sich in den Resten R_1 und R_2 unterscheiden. Die NMR-Signale der Reste R_1 und R_2 sind den Signalen der cis/trans 1-Propenylgruppen in 1 und 2 sehr ähnlich (vgl. Tab. 1 und 2). R und R' stellen also auch in 5 und 6 1-Propenylgruppen dar. Die olefinischen Protonen der Verbindung 5 koppeln mit 8,9 Hz. Zwischen den Methylprotonen (1,86 ppm) und dem olefinischen Proton (6,44 ppm) wird eine long range Kopplung von 1,5 Hz beobachtet. Die Doppelbindung hat demzufolge wie in Verbindung 2 cis-Konfiguration. Wie im Spektrum von Verbindung 1 überlagern sich auch im Spektrum von Verbindung 6 die Signale beider olefinischer Protonen zu einem System höherer Ordnung (6,36 ppm). Die Kopplungskonstante der Protonen und damit die Konfiguration der Doppelbindung kann daher hieraus nicht entnommen werden. Allerdings zeigt die Methylgruppe (1,92 ppm) keine long range Kopplung. Sie sollte damit wieder in cis-Stellung zum olefinischen Proton angeordnet sein. Die Doppelbindung der Verbindung 6 weist somit wie bei Substanz 1 trans-Konfiguration auf.

Damit sind die Strukturen der Verbindungen 5 und 6 festgelegt: Verbindung 5 ist

n-Propylthiosulfinsäure-S-cis-1-propenylester,

Verbindung 6 stellt

n-Propylthiosulfinsäure-S-trans-1-propenylester dar.

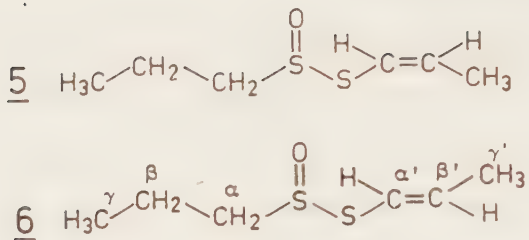


Abb. 15: Strukturen der Verbindungen 5 und 6

Zusammen mit den Verbindungen 1 und 2 sind die Substanzen 5 und 6 die ersten Vertreter der Stoffgruppe der α,β - ungesättigten Thiosulfinate, die aus Pflanzen isoliert wurden.

Warum bisher keine Verbindungen der Grundstruktur



aufgefunden wurden, ist nicht klar.

II.4. Verbindungen 3 und 4

II.4.1. Voruntersuchungen:

II.4.1.1. Verbindung 3:

Verbindung 3 wurde bei der DC auf Kieselgel nur geringfügig von den Substanzen 1 und 2 abgetrennt, verursachte aber keine Fluoreszenzminderung im UV 254. Detektion mit Godins Reagens führte beim Erhitzen zu spontaner, intensiver Rotfärbung. Mit Palladium(II)-chlorid Lösung reagierte 3 unter starker Braunfärbung. Natrium-Nitroprussidnatrium Lösung ergab keine Reaktion.

In der analytischen HPLC (System 1) wurde Substanz 3 etwa 2 min nach 1 und 2 eluiert. Das on-line aufgenommene UV-Spektrum zeigte ein schwaches Maximum bei 230 nm und ein sehr schwaches Maximum bei 255 nm. Nach Detektionsverhalten und UV-Spektrum sollte ebenfalls eine schwefelhaltige Verbindung, allerdings kein Thiosulfinat vorliegen.

Die S/O-Analyse ergab einen Sauerstoffgehalt von 9,3% und einen Schwefelgehalt von 38,2%. Die C/H/N-Analyse lieferte 44,5% Kohlenstoff und 16,1% Wasserstoff, aber keinen Stickstoff.

II.4.1.2. Verbindung 4:

Substanz 4 verhielt sich auf Kieselgel lipophiler als Substanz 3. Das UV- und Detektionsverhalten beider Substanzen war identisch. Die Retentionszeiten beider Verbindungen in der analytischen HPLC waren nur um 0,25 min verschieden (System 1), die on-line aufgenommenen UV-Spektren identisch. Substanz 4 sollte mit 3 strukturell eng verwandt sein.

II.4.2. Massenspektroskopie:

II.4.2.1. Verbindung 3:

Das Molekulargewicht von 3 ergab sich aus CI-Massenspektren zu 162. ^{34}S -Isotopenpeaks wiesen auf zwei Schwefelatome im Molekül hin. Im CI-MS war die Abspaltung eines Moleküls Wasser erkennbar. Bei Elektronenstoßionisation wurde kein Molekülpeak erhalten. Der prominenteste Peak bei höheren Massen erschien bei m/e 113. Dieser Peak wurde auch im CI-MS beobachtet. Aus den MS-Daten ergibt sich zusammen mit S/O- und C/H/N-Analyse die Summenformel zu $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OS}_2$.

II.4.2.2. Verbindung 4:

CI-Massenspektren zeigten für Verbindung 4 ebenfalls das Molekulargewicht 162 an. Fragmentierung und Signalintensitäten zeigten keine charakteristischen Unterschiede zu den Spektren der Verbindung 3.

II.4.3. NMR-Spektroskopie

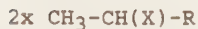
II.4.3.1. Verbindung 3

II.4.3.1.1. ^1H -NMR-Spektrum:

Das 80 MHz ^1H -NMR-Spektrum der Substanz 3 (in Abbildung 16) zeigt nur drei Signalgruppen.

Aufgrund der Summenformel ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}$) mußte ein symmetrisches Molekül vorliegen. Aus der Summenformel und der Integration des Spektrums folgte, daß das Dublett bei 1,15 ppm 6 Protonen, das Quartett bei 2,93 ppm 2 Protonen und das Singulett bei 4,12 ppm ebenfalls 2 Protonen repräsentierte.

Einstrahlung bei $\delta=1,15$ ppm (Dublett) und $\delta=2,93$ ppm (Quartett) zeigte die Kopplung beider Signalgruppen an. Es mußten demnach zwei magnetisch äquivalente $\text{CH}_3\text{-CH(R}_2\text{)}$ -Gruppen vorliegen. Die Entschirmung der Methinprotonen zeigte Substitution der C-Atome mit einem Heteroatom an, sodaß folgende Strukturteile gesichert waren:



Die beiden stark entschirmten Protonen bei 4,12 ppm zeigten keine Kopplungen. An den benachbarten C-Atomen befanden sich demnach entweder keine, oder jeweils magnetisch äquivalente Protonen. Die Resonanzlage zeigte Substitution der entsprechenden C-Atome mit zwei Heteroatomen an.

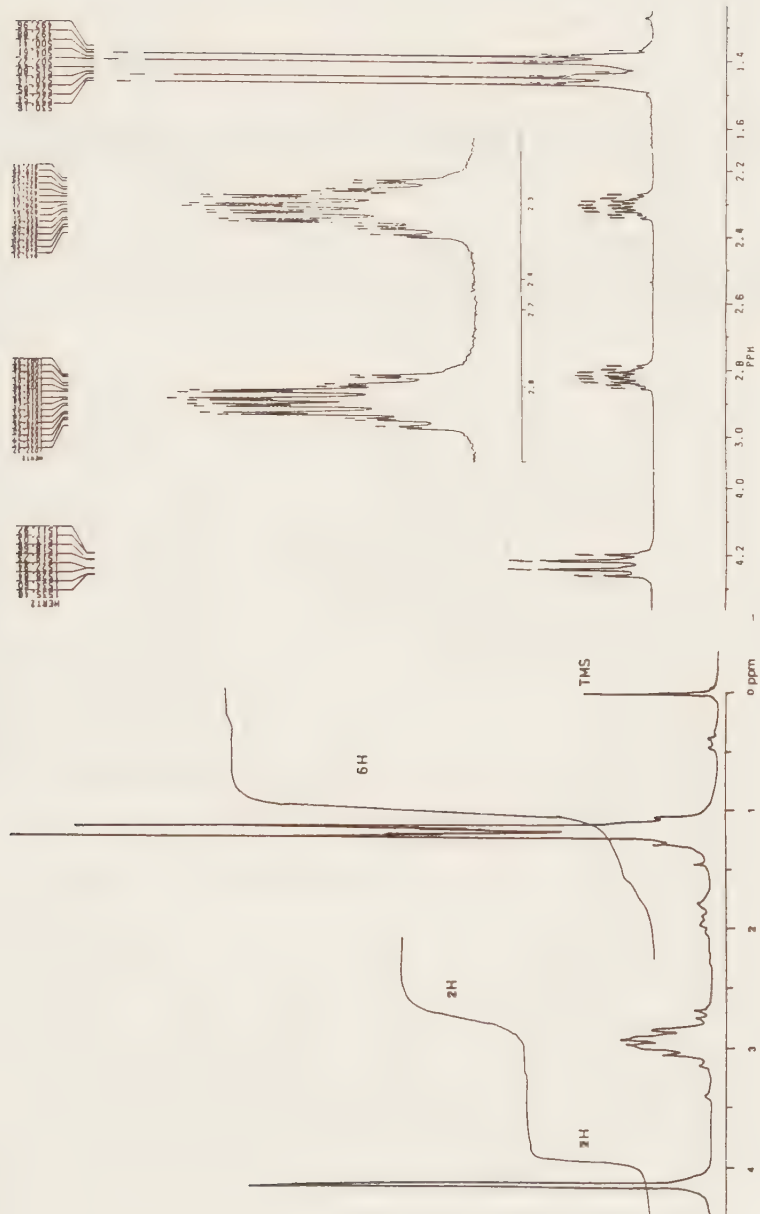


Abb. 16: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der Substanzen 3 und 4 (80/360 MHz); Spektrum von 4 mit gedehnten Ausschnitten

Mit diesen Strukturteilen war nur ein cyclisches Molekül, ein 1,4-Dithianderivat (s. Abb. 17) denkbar.

Das verbleibende Sauerstoffatom mußte in Form einer Epoxidfunktion zwischen C1 und C6 vorliegen, damit die Molekülsymmetrie gewahrt blieb.

Substanz 3 ist somit

3,4-Dimethyl-7-oxa-2,5-dithia bicyclo [4.1.0.] heptan

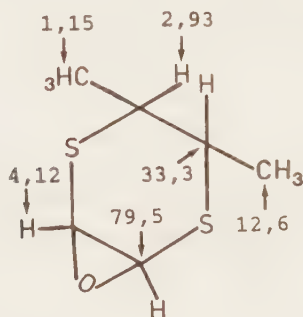


Abb. 17: Konstitution der Verbindung 3 mit Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Signale

Aus Symmetriegründen müssen die Methylgruppen cis-ständig angeordnet sein.

II.4.3.1.2. ^{13}C -NMR-Spektrum:

Das 20 MHz ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung 3 zeigt wie erwartet lediglich drei Signale bei 12,6 ppm, 33,3 ppm und 79,5 ppm. Diese können wie in Abbildung 17 gezeigt zugeordnet werden. Die Multiplizität der Signale in einem "off-resonance"-Spektrum bestätigt Struktur und Signalzuordnung.

II.4.3.2. Verbindung 4

Tabelle 6 zeigt die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Verbindungen 3 und 4 im Vergleich.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Atome	Verbindung <u>3</u>	Verbindung <u>4</u>
$-\text{CH}_3$	1,15 (d; 7 Hz)	1,43 (d; 6,8 Hz) 1,48 (d; 7,3 Hz)
$-\text{S}-\text{CH}(\text{R}_2)$	2,93 (q; 7 Hz)	2,33 (dq; 3,9/7,3/1,2 Hz) 2,83 (dq; 3,9/6,8/1,0 Hz)
$\text{H}-\text{C}-(\text{OSR})$	4,12 (s)	4,30 (d; 1,0 Hz)
$-\text{CH}_3$	12,6 (q)	14,3/15,7
$-\text{S}-\text{CH}(\text{R}_2)$	33,3 (d)	39,4/48,0
$\text{H}-\text{C}-(\text{OSR})$	79,5 (d)	77,8/79,3

Tab. 6: ^1H -NMR- (bei 80 bzw. 360 MHz) und ^{13}C -NMR- (bei 20 bzw. 90 MHz) Daten der Verbindungen 3 und 4;

Anstelle der Quartetts der $\text{H}-\text{C}(\text{R}_2)-\text{S}$ - Protonen von Verbindung 3 erscheinen bei Verbindung 4 zwei Quartetts von Dubletts (s. Abb. 16). Diese zeigen bei 360 MHz eine Feinaufspaltung von ca. 1 Hz infolge long range Kopplung mit den entschirmten Protonen bei 4,30 ppm. Das Dublett der magnetisch äquivalenten Methylgruppen von 3 ist nun in zwei Dubletts aufgetrennt. Die beiden Protonen bei niedrigem Feld liefern in 4 ein Doppeldublett. Das Doppeldublett erscheint als A/B-System und ist durch die lange range Kopplung nochmals aufgespalten.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum der Substanz 3 fallen die Signale je zweier C-Atome zusammen. In 4 liegt keine magnetische Äquivalenz mehr

vor und die Kohlenstoffsignale sind verschieden. Die Molekülsymmetrie der Verbindung 3 ist in 4 aufgehoben. Die Methylgruppen sind in 3 cis-, in 4 dagegen trans-ständig angeordnet.

Substanz 4 ist demnach

trans-3,4-Dimethyl-7-oxa-2,5-dithia bicyclo [4.1.0.] heptan

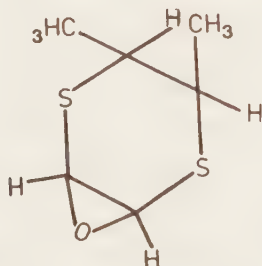


Abb. 18: Konstitution von Verbindung 4

Die Verbindungen 3 und 4 stellen als 1,4-Dithiane Vertreter einer Gruppe bisher nicht beschriebener Naturstoffe dar.

Aus Allium sativum L. sind 2-Vinyl-4H-1,3-dithiin und 3-Vinyl-4H-1,2-dithiin isoliert worden [52], die Kondensationsprodukte des Allicins darstellen. Ob die neuen 1,4-Dithiane aus Allium cepa L. ebenfalls aus Thiosulfinsäureestern gebildet werden ist bisher nicht bekannt.

Die räumliche Anordnung der Substituenten am Dithiangerüst war für beide Verbindungen noch zu bestimmen.

II.4.4. Bestimmung der Konformation der Verbindungen 3 und 4:

Um Informationen über die Konformation von 3 und 4 zu erhalten wurden Kopplungskonstanten analysiert und NMR-Messungen bei verschiedener Temperatur sowie NOE-Experimente durchgeführt. Darüberhinaus wurde versucht, durch Annäherung von simulierten NMR-Spektren an die gemessenen Resonanzen Rückschlüsse auf die

räumliche Anordnung der Moleküle zu ziehen.

Beide Verbindungen sind bis auf den Dreiring der Epoxidstruktur flexibel. Bei Raumtemperatur und +70°C gemessene Spektren beider Substanzen waren identisch. Das bedeutet, daß die Moleküle durch Temperaturerhöhung um 50°C keine meßbare Beschleunigung ihrer Umklappbewegung erfahren. Dies ist nur dann erklärbar, wenn die Moleküle bereits bei Raumtemperatur sehr schnell zwischen verschiedenen räumlichen Anordnungen umklappen.

Die gemessenen NMR-Spektren geben die über die Zeit gemittelte chemische Verschiebung der Kerne an. Abbilung 19 zeigt die beiden Konformationen, zwischen denen 3 bzw. 4 schwingen.

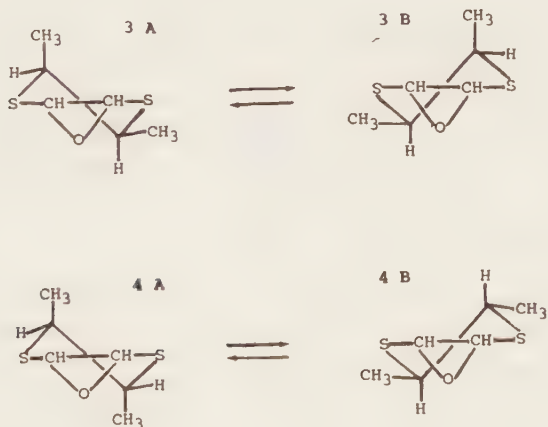


Abb. 19: Extremkonformationen der Verbindungen 3 (3A und 3B) und 4 (4A und 4B)

Das Zusammenfallen je zweier Signale in den NMR-Spektren von 3 kann am Beispiel der Methylgruppen wie folgt erklärt werden: Der Durchschnitt der chemischen Verschiebung der Extremwerte einer Methylgruppe ist identisch mit dem Durchschnitt der chemischen Verschiebungen der anderen CH₃-Gruppe. Mit anderen Worten: Beide Methylgruppen klappen in 3 zwischen identischen Grenzpositionen um.

In Verbindung 4 dagegen unterscheiden sich die über die Zeit gemittelten chemischen Verschiebungen der Methylgruppen, da sie bezüglich der Epoxidfunktion im Durchschnitt verschiedene räumliche Anordnung aufweisen.

Dieselben Überlegungen gelten für die übrigen ^1H - und ^{13}C -Kerne in 3 und 4.

Aus dem Auftreten von NOE an den $\text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{S}$ - Protonen nach Einstrahlen bei 4,12 ppm folgt, daß in 3 beide Protonensorten räumlich benachbart sind.

In 4 wurde nach Einstrahlen bei 4,30 ppm kein NOE beobachtet, was eine größere Entfernung beider Methin-Protonensorten bedeutet. Dieser Befund wird durch das Auftreten von long range Kopplungen von über 1 Hz zwischen den Signalen bei ca. 4,30 ppm und den Signalen bei 2,33 ppm und 2,83 ppm in 4 unterstrichen. Durch Computersimulation der NMR-Spektren verschiedener Konformationen der Moleküle gelang es, die über die Zeit gemittelte Konformationen anzugeben, die in den tatsächlich gemessenen Spektren ihren Ausdruck findet. In Abbildung 20 ist diese Konformation für die Verbindung 3 wiedergegeben.

II.5. Zusammenfassung:

Die in den beiden antiasthmatisch wirksamen Unterfraktionen der Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft enthaltenen Verbindungen gehören zwei Substanzklassen an:

Bei den Verbindungen 3 und 4 handelt es sich um neue 1,4-Dithianderivate mit Epoxidfunktion. Die Substanzen 1, 2, 5, 6 und 7 sind Thiosulfinsäureester. α,β -ungesättigte Thiosulfinate (1, 2, 5 und 6) sind bisher weder isoliert noch synthetisiert worden.

Verbindung 3 hatte sich in vivo als inaktiv erwiesen. Für Substanz 4 war aufgrund ihrer großen strukturellen Ähnlichkeit mit 3 ebenfalls keine Wirksamkeit zu erwarten. Damit waren die Thiosulfinate als die antiasthmatischen Wirkstoffe des Zwiebelextraktes erkannt.

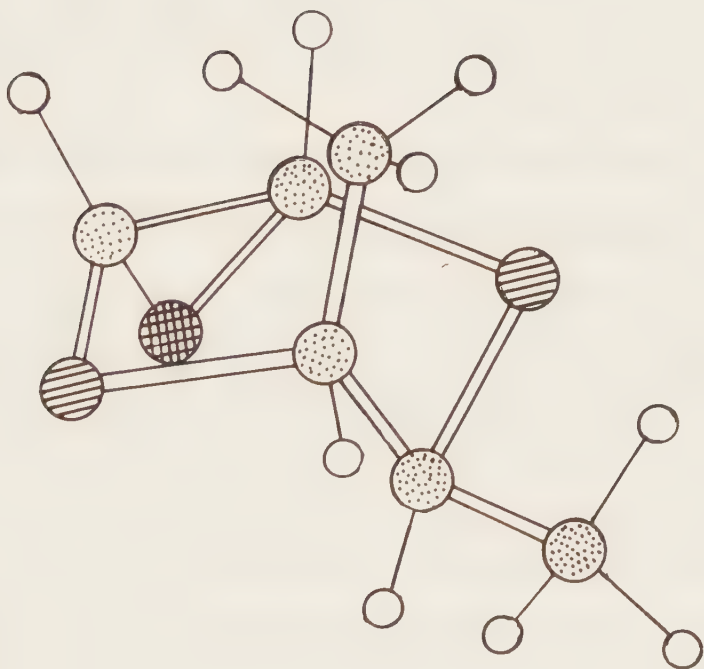


Abb. 20: Über die Zeit gemittelte Konformation von Verbindung 3

III. Untersuchung der Fraktion II/4:

Die Unterfraktion, die bei der Säulenchromatographie an Kieselgel mit Toluol/Ethylacetat (10:2) nach Fraktion II/3 eluiert wurde, zeigte sowohl im 5-Lipoxygenase- als auch im Cyclooxygenasehemmtest deutliche Aktivität. In den bei Screeninguntersuchungen mit Extrakten und Fraktionen verwendeten Konzentrationen wurden beide Enzymsysteme durch Fraktion II/4 zu 100% inhibiert. Die Fraktion II/4 wurde deshalb auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht.

III.1. Chromatographische Charakterisierung der Fraktion II/4

III.1.1. Kieselgel-Dünnschichtchromatographie:

In der DC erschien in Chloroform/Aceton (100:4) eine Palladium(II)-chlorid positive Zone bei $R_f=0,3$. In dem System Toluol/Ethylacetat (10:3) wurde eine mäßige, in n-Hexan/Ethylacetat (10:4) eine bessere Auftrennung in zwei $PdCl_2$ positive Hauptzonen ($R_f=0,24/0,19$) mit Fluoreszenzminderung im UV 254 erreicht. Mit Godins Reagens zeigten beide Hauptzonen Braungraufärbung.

III.1.2. Hochdruckflüssigchromatographie:

Fraktion II/4 lieferte im HPLC-Chromatogramm (System 1) einen Hauptpeak bei $R_t=15,9$ min sowie einen Nebenpeak bei $R_t=16,8$ min. Weitere geringer konzentrierte Peaks erschienen bei den Retentionszeiten 5,2/10,9/14,4/20,3 und 25,5 min.

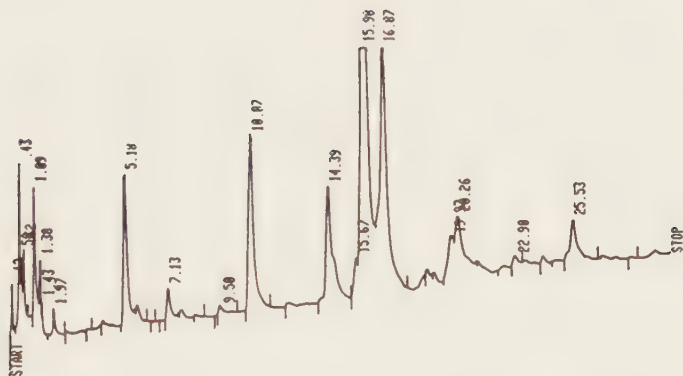


Abb. 21: HPLC-Chromatogramm der Fraktion II/4 (System 1);

III.2. Isolierung der Hauptkomponenten der Fraktion II/4:

Durch MPLC an Kieselgel mit Hexan/Ethylacetat (10:4) als Eluens wurden die beiden Hauptkomponenten 4/A und 4/B getrennt. Die HPLC-Chromatogramme beider Komponenten mit je einem Hauptpeak bei $R_t=15,9$ min und einem Nebenpeak bei $R_t=16,8$ min waren überraschenderweise mit dem der Gesamtfraktion nahezu deckungsgleich.

Auf HPTLC-Platten gelang im LM-System Hexan/EtOAc (10:4) aus Fraktion 4/A und 4/B jeweils die Abtrennung einer Zone, die einen geringfügig höheren R_f -Wert aufwies als die jeweilige Hauptkomponente.

Mittels HPTLC trennte sich die Fraktion II/4 in vier Zonen, während die analytische HPLC nur zwei Peaks zeigte. Um die HPTLC-Zonen den HPLC-Peaks zuzuordnen, wurde mit Hilfe der analytischen HPLC aus beiden Proben 4/A und 4/B eine kleine Menge der Verbindungen mit $R_t=15,90$ min und $R_t=16,80$ min aufgefangen. HPTLC-Untersuchung der gewonnenen Substanzen zeigte, daß die Hauptpeaks in 4/A und 4/B ($R_t=15,90$ min) auf Kieselgel die hydrophileren Hauptkomponenten darstellten. Den Nebenpeaks ($R_t=16,80$ min) waren jeweils die auf Kieselgel lipophileren Komponenten zuzuordnen. Die Substanzen wurden entsprechend ihrer zunehmenden Polarität auf Kieselgel mit 4/1, 4/2, 4/3 und 4/4 bezeichnet.

LM: n-Hexan/Ethylacetat (10:4)

Det.: UV 254

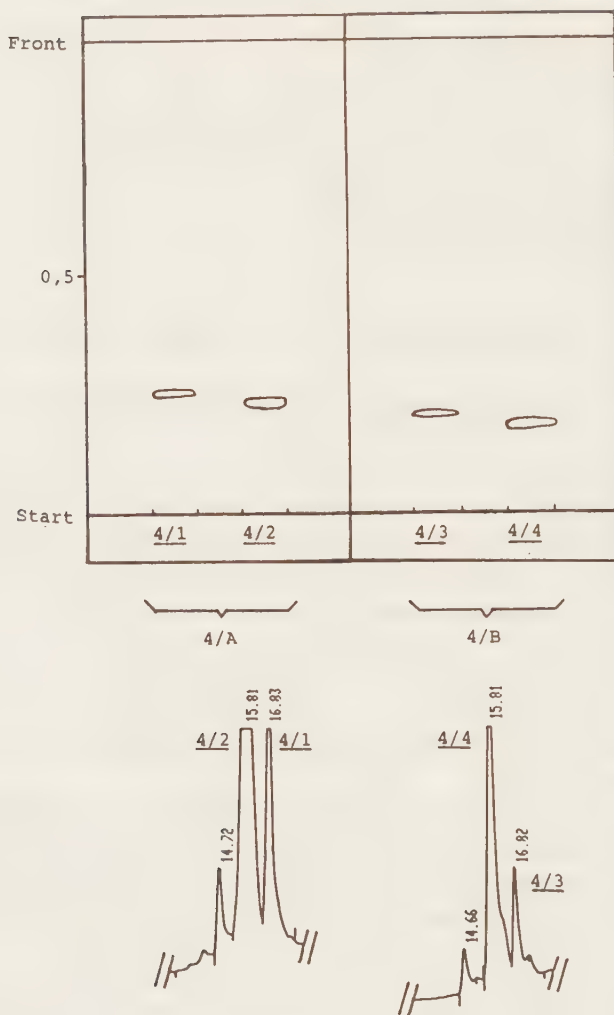


Abb. 22: HPTLC-Chromatogramme von 4/1 bis 4/4 mit Zuordnung der Substanzen zu den HPLC-Chromatogrammen der Unterfraktionen 4/A und 4/B (System 1; Ausschnitte)

Die Substanzen 4/1 bis 4/4 wurden durch MPLC mit n-Hexan/Ethylacetat (10:3) als Eluens aus der Fraktion II/4 isoliert. Aus 250 mg Fraktion II/4 wurden neben diversen Substanzgemischen 11 mg 4/1, 32mg 4/2, 15 mg 4/3 und 20 mg 4/4 erhalten. Nach Endreinigung an einer Kieselgelsäule verblieben 1,2 mg 4/1, 6,5 mg 4/2, 2,4 mg 4/3 und 5,2 mg 4/4.

Die analytische HPLC-Untersuchung der erhaltenen Substanzen zeigte, daß die Substanzen 4/1 und 4/3 im Peak der Retentionszeit 16,80 min und die Substanzen 4/2 und 4/4 im Peak der Retentionszeit 15,90 min zusammenfielen.

III.3. Strukturaufklärung der Substanzen 4/1 bis 4/4

III.3.1. Voruntersuchungen:

Die Verbindungen verhielten sich bei der DC auf Kieselgel hydrophiler, in der reversed-phase HPLC lipophiler als die bis zu diesem Zeitpunkt isolierten Thiosulfinate und Dithiane. Das Detektionsverhalten aller vier Komponenten war identisch. Mit Godins Reagens zeigte sich Braungrau-, mit Palladium(II)-chlorid Lösung Braun- und mit alkalischer Natrium-Nitroprussidnatrium Lösung Rotfärbung. Die on-line aufgenommenen UV-Spektren mit Schultern bei 235 nm (4/2 und 4/4) bzw. 240 nm (4/1 und 4/3) sprachen für nichtaromatische Chromophore. Es war also mit schwefelhaltigen, längerkettigen und evtl. ungesättigten Verbindungen zu rechnen, die vermutlich wieder eine Sulfoxidgruppe enthielten.

III.3.2. Massenspektroskopie

III.3.2.1. Verbindungen 4/1 und 4/3:

Wie bei den Thiosulfinen und Dithianen wurde bei den Verbindungen 4/1 bis 4/4 die CI-Massenspektroskopie zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen, da mit Elektronenstoßionisation wiederum keine Molekülpeaks erhalten werden konnten. Abbildung 23 zeigt zum Vergleich die EI- und CI-Massenspektren der Substanz 4/1.

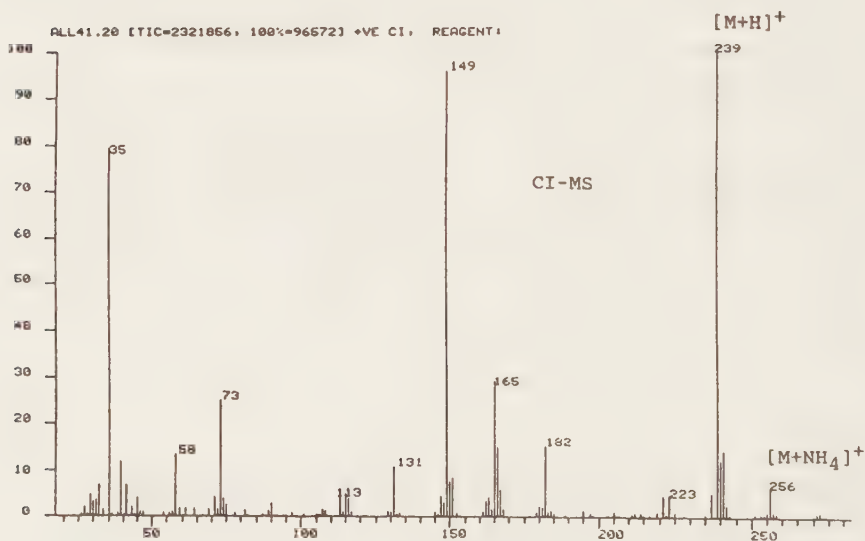
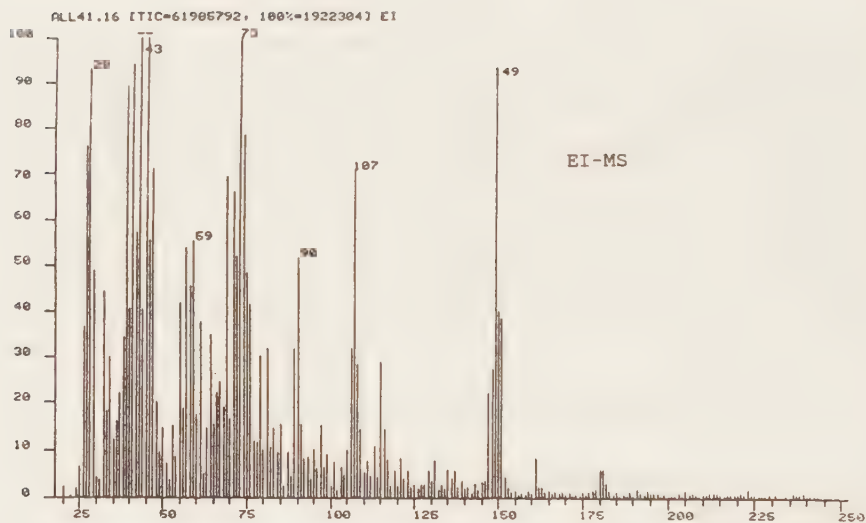


Abb. 23: EI-und CI-Massenspektrum der Substanz 4/1

Im CI-MS ist der $[M+H]^+$ -Peak bei m/e 239 Basispeak, d.h. die Substanz 4/1 hat das Molekulargewicht 238. Der $[M+NH_4]^+$ -Peak bei m/e 256 ist mit weniger als 10% der Intensität des Basispeaks wenig prominent. Der $[M+H]^+$ -Peak ist von einem ^{34}S -Isotopenpeak der Intensität 12% des Molekülpeaks begleitet. Das Molekül sollte demnach drei Schwefelatome enthalten. Ein Peak bei m/e 149 erscheint im CI-MS mit etwa 80% Intensität. Das dazugehörige Molekülfragment liefert im EI-MS den prominentesten Peak bei höheren Massen. Der Basispeak im EI-MS wird bei m/e 43 beobachtet, was für die Abspaltung einer Propylgruppe aus dem Molekül spricht. Da die EI- und CI-Massenspektren von 4/3 praktisch identisch mit den Spektren von 4/1 sind, besitzt 4/3 wie 4/1 das Molekulargewicht 238.

III.3.2.2. Verbindungen 4/2 und 4/4: ,

Die Substanzen 4/2 und 4/4 besitzen bei untereinander fast gleichen MS-Fragmentierungen das Molekulargewicht 236. ^{34}S -Isotopenpeaks zeigen wie in 4/1 und 4/3 drei Schwefelatome an. In den EI-Massenspektren sind keine Molekülionen zu beobachten. Der prominenteste Peak bei höheren Massen erscheint im EI-MS bei m/e 147. Dieser Peak ist auch im CI-MS deutlich ausgeprägt.

III.3.3. 80 MHz 1H -NMR-Spektren:

Da die Niederfeld Protonen-Kernresonanzspektren der Substanzen 4/1 und 4/3 bzw. 4/2 und 4/4 nahezu identisch sind, gelten für eine Verbindung gemachte Aussagen jeweils auch für die andere.

III.3.3.1. Substanzen 4/1 und 4/3:

Zwei Triplets bei etwa 1,0 und 1,25 ppm sollten von zwei $CH_3-CH_2-CR_3$ -Gruppen stammen. Ein Dublett bei etwa 2,0 ppm, das für drei Protonen integrierte, konnte von einer Methylgruppe in Nachbarschaft zu einem ungesättigten Strukturteil also z.B. einer $CH_3-CH=CR_2$ -Gruppe stammen.

Analoge Signallagen waren auch bei den Methyl-1-propenylthio-sulfonaten zu beobachten gewesen. Ein Triplet bei etwa 2,75 ppm (2H) war durch elektronegative Substitution ähnlich entschirmt wie die α -Methylengruppen in Thiosulfonaten. Noch stärker entschirmt erschien bei 3,5 bzw. 3,75 ppm ein Proton, das in ein Doppeldublett aufgespalten war. Die Signalgruppe der ungesättigten Protonen lag bei 6,5 ppm (2H) und zeigte damit die Nachbarschaft der Doppelbindung(en?) zu elektronenziehenden Gruppen an.

Damit können aus den 80 MHz ^1H -NMR-Spektren der Verbindungen 4/1 und 4/3 folgende Strukturteile abgeleitet werden:

- 2x $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CR}_3$
- 1x $\text{CH}_3\text{-CH=CR}_2$
- 1x $\text{X-CH}_2\text{-CH}_2\text{-R}$
- 1x R-CH=CH-X
- 1x $\text{H-C-(X}_2\text{)R}$

X steht dabei für entschirmende Substituenten

Darüberhinaus zeigten beide Spektren eine Signalgruppe bei 1,75 ppm, deren Multiplizität aufgrund der Überlagerung mit anderen Signalen nicht zu deuten war.

III.3.3.2. Substanzen 4/2 und 4/4:

Ein Methyltriplett bei 1,1 ppm, ein Methyldublett bei 1,9 ppm, das entschirmte Proton (dd) bei 3,5 ppm sowie die Signalgruppe zweier olefinischer Protonen bei 6,5 ppm waren in 4/2 und 4/4 ebenso erkennbar wie in 4/1 und 4/3.

Das Methylen-triplett bei 2,75 ppm fehlt, wogegen ein zusätzliches Dublett bei 1,75 ppm erscheint, das analog zum Dublett bei 1,9 ppm von einer etwas schwächer entschirmten Methylgruppe

an einer Doppelbindung stammen konnte. Für das Vorliegen einer weiteren $\text{CH}_3\text{-CH=CR}_2$ -Gruppe sprach auch eine zusätzliche Signalgruppe von wiederum zwei olefinischen Protonen bei ca. 6,0 ppm. Dieses zweite Paar Protonen eines ungesättigten Systems ist weniger stark entschirmt als die olefinischen Protonen, die auch in 4/1 und 4/3 auftreten. Somit waren für die Substanzen 4/2 und 4/4 folgende Strukturteile ableitbar:

- 1x $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CR}_3$
- 2x $\text{CH}_3\text{-CH=CR}_2$
- 2x R-CH=CH-X
- 1x $\text{H-C-(X}_2\text{)R}$

X steht wiederum für entschirmende Substituenten, für die in Anbetracht der Herkunft der Substanzen aus Allium cepa L. zunächst Sulfid-, Disulfid-, Sulfoxid- oder Thiosulfinat-Gruppen in Betracht kamen.

III.3.4. Festlegung der Strukturen von 4/1 bis 4/4:

Aus den 80 MHz-NMR Spektren waren zwar gewisse Strukturteile mit einiger Sicherheit abzuleiten, eine Festlegung der Struktur der Substanzen 4/1 bis 4/4 konnte jedoch nur mit Hilfe von Hochfeld NMR-Spektren sowie zusätzlicher Informationen aus den Massenspektren erfolgen.

III.3.4.1. Verbindung 4/1

III.3.4.1.1. Hochfeld NMR:

Die Struktur des CH-Gerüsts von 4/1 wurde mit Hilfe von 360 MHz ^1H -NMR-Spektren (s. Abb. 24), sowie Entkopplungsexperimenten ermittelt.

Beide olefinische Protonen erscheinen als A,B-System, koppeln mit 14,9 Hz und repräsentieren damit eine trans-Doppelbindung. Die Dubletts beider Protonen sind jeweils in ein Quartett aufgespalten. Das Quartett des Protons bei tieferem Feld zeigt eine Kopplungskonstante von 6,8 Hz, das Proton bei höherem Feld weist eine long range Kopplung von etwa 1,4 Hz auf. Das Methyldublett (siehe Niederfeldspektren) bei 1,97 ppm zeigt neben der 6,3 Hz Kopplung ebenfalls eine Feinaufspaltung von 1,4 Hz. Damit ist eine trans-1-Propenylgruppe als erster Strukturteil festgelegt. Die chemische Verschiebung der olefinischen Protonen (ca. 6,5 ppm) weist auf einen entschirmenden Substituenten an der Doppelbindung hin.

Das Doppeldublett des Protons bei 3,68 ppm zeigt Kopplungskonstanten von 10,8 und 3,6 Hz. Einstrahlung bei dieser Signalfrequenz vereinfacht die Multipletts bei 2,20 und 1,42 ppm, die für je ein Proton integrieren. Diese Signale werden auch durch Entkopplung des Triplets der Methylgruppe bei 1,17 ppm vereinfacht. Das Kopplungsmuster der Signale des Protons bei 3,68 ppm zeigt zusammen mit der chemischen Verschiebung eine Substitution mit zwei Heteroatomen an. Daraus folgt, daß die Signale bei 3,68/ 2,20/ 1,42 und 1,17 ppm von einer $\text{H-C(X}_2\text{)-CH}_2\text{-CH}_3$ -Gruppe stammen, wobei die Methylenprotonen stark unterschiedliche chemische Verschiebungen zeigen. Jedes dieser magnetisch nicht äquivalenten Methylenprotonen koppelt mit dem entschirmten Proton bei 3,68 ppm, dem zweiten Methylenproton sowie den Protonen der Methylgruppe. Die Signale der Quartetts von Doppeldubletts der anisotropen Methylenprotonen sind zum Teil überlagert und erscheinen als Multipletts. Die verbleibenden Signale des Spektrums stammen von einer $\text{X-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$ -Gruppe, da sich die Triplets bei 1,01 und 2,78 ppm nach Einstrahlung bei 1,73 ppm vereinfachten. Das Signal bei 1,73 ppm ist somit als "Sextett" einer Methylengruppe mit fünf Nachbarprotonen zu interpretieren, wobei die Kopplungskonstanten sowohl zwischen der Methylengruppe bei 1,73 ppm und der Methylengruppe bei 2,78 ppm als auch der Methylengruppe bei 1,73 ppm und der Methylgruppe bei 1,01 ppm nahezu gleich sind.

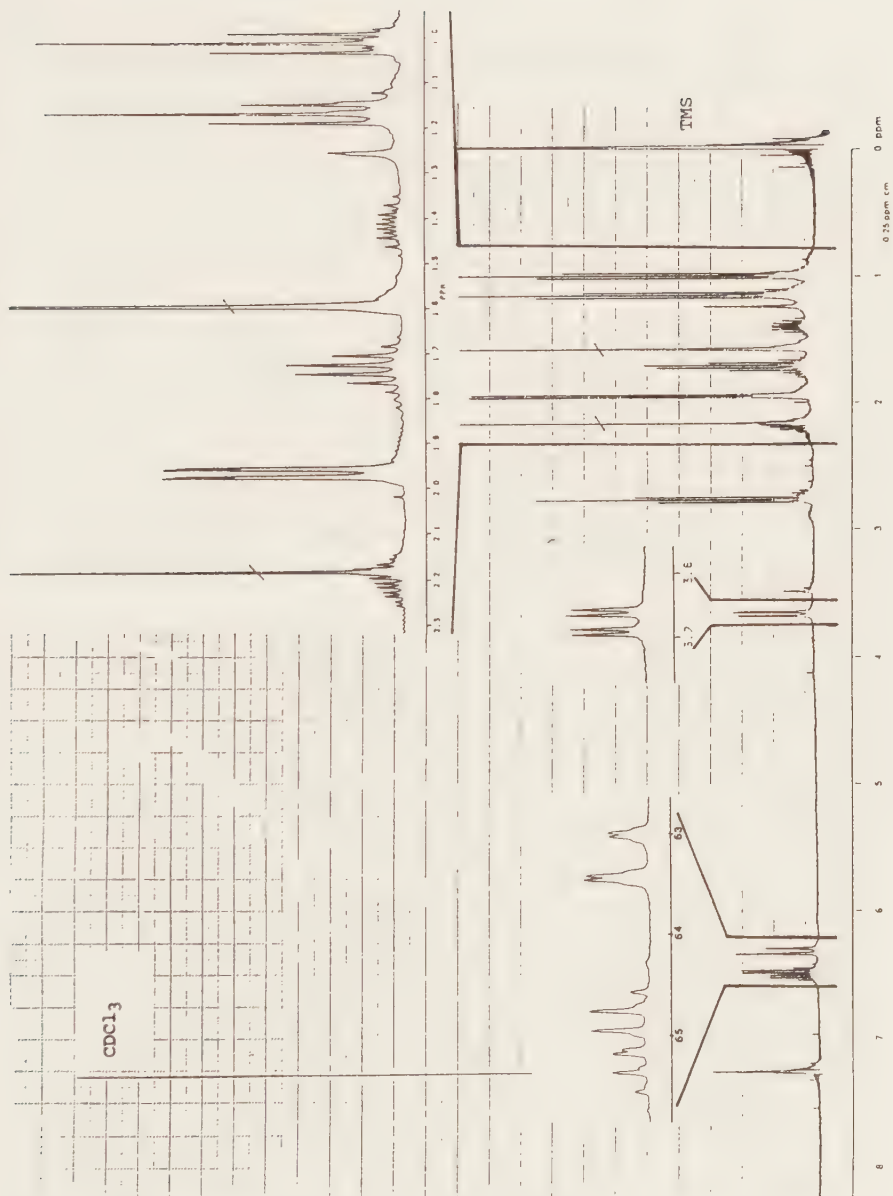
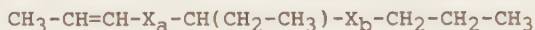


Abb. 24: ^1H -NMR-Spektrum der Substanz 4/1 (360 MHz; CDCl_3 ; TMS) mit gedehnten Ausschnitten.

Damit ergeben sich für Substanz 4/1 folgende Teilstrukturen:

- $\text{CH}_3\text{-CH=CH-X}_a\text{-}$ (trans)
- $\text{-X}_a\text{-CH(CH}_2\text{-CH}_3\text{)-X}_b\text{-}$
- $\text{-X}_b\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$

Daraus wiederum kann man nachstehenden Strukturtyp ableiten:



Aus dem CH-Gerüst der Verbindung, dem Molekulargewicht und dem Vorhandensein von drei Schwefelatomen im Molekül (Isotopen-peaks!) folgt die Summenformel zu $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{OS}_3$. Die Heterobrücken bestehen also aus drei Schwefelatomen und einem Sauerstoffatom.

Die chemischen Verschiebungen der zu den Heterobrücken benachbarten Protonen lassen Schlüsse auf die Art der Heterobrücken zu. Die zu X_b benachbarte Methylengruppe geht bei 2,78 ppm in Resonanz. Diese chemische Verschiebung steht im Einklang mit den Literaturdaten für α -Methylengruppen in Disulfiden. So findet man z.B. für das Phenylethyldisulfid einen Wert von 2,71 ppm [48] und für Dineopentylidisulfid einen Wert von 2,76 ppm [53].

Für α -Methylengruppen in Sulfoxiden finden sich Resonanzlagen von z.B. 2,60 ppm (2,6-Dithiaheptan-2-oxid) [54] und 2,67 ppm (n-Propylphenylsulfoxid) [53].

Für die α -bzw. α' -Methylengruppen in Thiosulfinaten und Thiosulfonaten werden Resonanzen von über 3,0 ppm angegeben [48,53].

Die α -Methylengruppen von Dineopentylsulfid gehen bei 2,45 ppm in Resonanz [53].

Demnach scheiden für X_b sowohl eine Sulfidbrücke als auch eine Thiosulfinat- oder Thiosulfonatstruktur aus. Für X_b kommt somit eine Disulfidbrücke oder weniger wahrscheinlich eine Sulfoxidstruktur in Frage. Aufgrund der Summenformel verbliebe für X_a jeweils das andere Strukturteil.

III.3.4.1.2. Weitere Strukturinformationen für 4/1 aus den Massenspektren:

Nach den chemischen Verschiebungen im ^1H -NMR Spektrum waren noch zwei Strukturen für die Substanz 4/1 möglich. Abbildung 25 zeigt die zu erwartenden MS-Fragmentierungen für beide mögliche Moleküle:

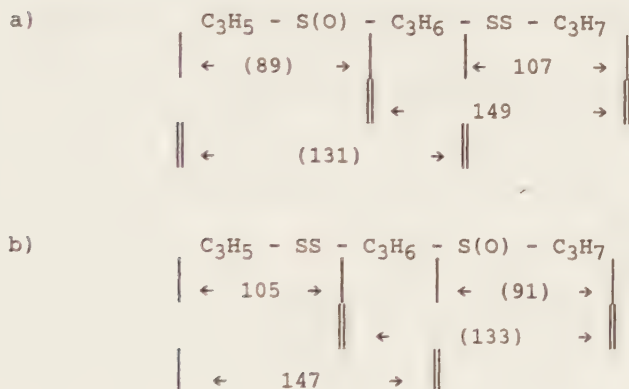
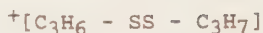


Abb. 25: Mögliche Strukturen von Substanz 4/1 mit zu erwartenden MS-Fragmentierungen

Sowohl im CI-als auch im EI-MS ist der Peak bei m/e 149 deutlich ausgeprägt. Im CI-MS ist bei m/e 151 ein Peak mit 8% der Intensität des Peaks bei m/e 149 zu beobachten. Das deutet auf die Anwesenheit von 2 Schwefelatomen in diesem Fragment hin. Im EI-MS tritt bei m/e 107 ein prominenter Peak in Erscheinung. Prominente Peaks bei m/e 147, m/e 133 und m/e 105 werden nicht beobachtet. Somit kann der oben angegebene Strukturvorschlag b verworfen werden. Der Peak bei m/e 131 tritt gegenüber m/e 149 kaum in Erscheinung.

Dies zeigt, daß das Fragment



durch bessere Delokalisierbarkeit der Ladung stabiler ist als Fragment



Damit war die Struktur der Verbindung 4/1 geklärt. Es handelt sich um

trans-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2-decen-4-S-oxid

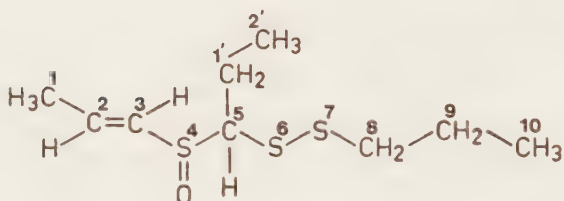


Abb. 26: Strukturformel von Verbindung 4/1

Das Molekül enthält am Sulfoxid und am Kohlenstoffatom in Stellung 5 zwei Asymmetriezentren. Über deren Konfiguration ist mit den bisher zur Verfügung stehenden Informationen keine Aussage möglich.

III.3.4.2. Verbindung 4/3:

4/3 weist mit 238 dasselbe Molekulargewicht auf wie 4/1. EI- und CI-Massenspektren zeigen keine charakteristischen Unterschiede. Im 2D-¹H-Cosy-NMR-Spektrum sind die gleichen Molekülfragmente nachzuweisen wie in 4/1. Die Doppelbindung weist auch in 4/3 nach der Kopplungskonstante der olefinischen Protonen von 15,1 Hz trans-Konfiguration auf.

Ein Vergleich der ^1H -NMR-Daten beider Verbindungen (Tab. 7) zeigt, daß nur bei den Protonen an den Kohlenstoffatome 3, 5 und 1' deutliche Unterschiede in der chemischen Verschiebung zu beobachten sind.

Proton an C	1	2	3	5	1'a	1'b	2'	8	9	10
Verb. <u>4/1</u>	1,97	6,51	6,33	3,68	1,42	2,20	1,17	2,78	1,73	1,01
Verb. <u>4/3</u>	1,97	6,55	6,44	3,48	1,89	2,27	1,14	2,73	1,71	1,00

Tab. 7: Chemische Verschiebungen der Protonen der Verbindungen 4/1 und 4/3 bei 360 bzw. 300 MHz

Diese Befunde zeigen, daß Verbindung 4/1 und Verbindung 4/3 die gleiche Konstitution aufweisen. Die Moleküle unterscheiden sich in der räumlichen Anordnung an den beiden Asymmetriezentren (Sulfoxid und C 5). Nachdem beide Substanzen chromatographisch trennbar sind, kann es sich nicht um optische Antipoden handeln. 4/1 und 4/3 müssen Diastereomere sein. Eine Verbindung weist demnach dd oder ll Konfiguration auf, die andere dl oder ld. Welcher Verbindung welche Konfiguration zukommt, ist auch anhand der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Protonen beider Verbindungen nicht zu entscheiden.

III.3.4.3. Verbindung 4/2

III.3.4.3.1. Hochfeld NMR:

Hochfeld ^1H -NMR-Spektren (Abb. 27-30) zeigten, daß die Substanz 4/2 nicht einheitlich war. Es lag eine Mischung zweier Komponenten vor, die chromatographisch nicht getrennt werden konnten. Es war aber möglich, ihre Struktur aus den Mischspektren zu ermitteln.

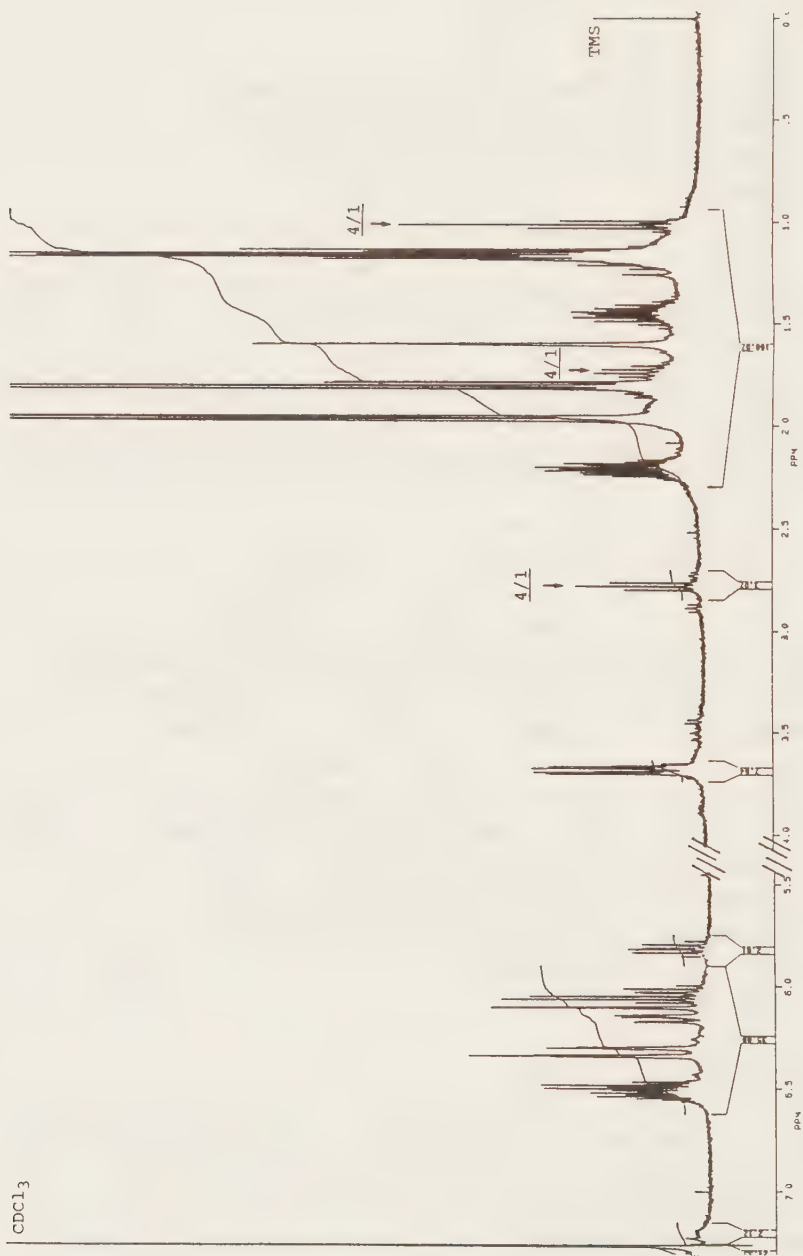


Abb. 27: 400 MHz ^1H -NMR Spektrum von 4/2;

BRUKER

HE360C1.SMX
F1:PROJ: 001
TEST 001
F2:PROJ: 001
TEST 001
AL:PROJ: 001
COSY AU
DATE 2-12-87
SI2 2048
SI1 1024
SM2 2906.977
SM1 1453.488
NU0 1

$\beta = 4/1$

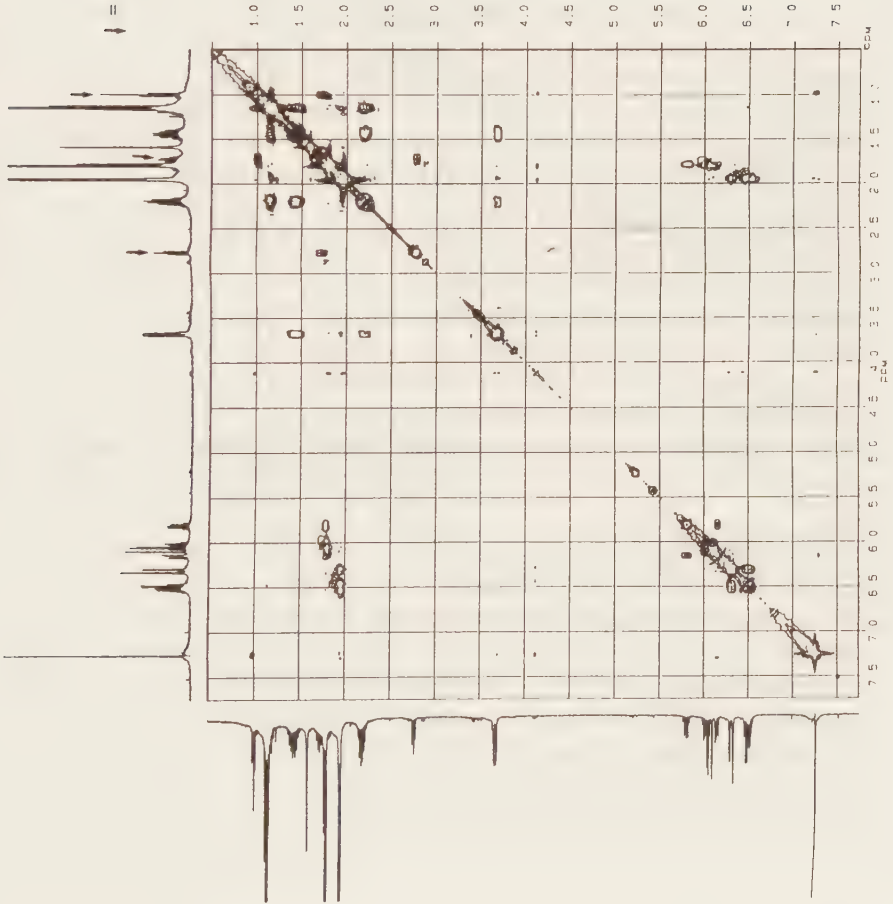
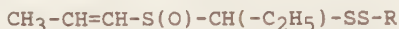


Abb. 28: 2D-¹H-Cosy Spektrum von 4/2

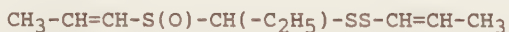
Verglichen mit den Spektren der Verbindungen 4/1 bzw. 4/3 fehlen im Spektrum von 4/2 die Signale der R-SS-C₃H₇ Gruppe bei 2,7 ppm, 1,7 ppm und 1,0 ppm. Die Substanz ist mit ca. 8% 4/1 verunreinigt, sodaß schwache Signale von 4/1 beobachtet werden (s. Abb. 27).

Die Signale des Restmoleküls von Substanz 4/1



werden bei 1,96 ppm, 6,51 ppm, 6,32 ppm, 3,68 ppm, 1,45 ppm, 2,21 ppm und 1,16 ppm beobachtet. Zusätzlich zu diesen Signalgruppen sind in 4/2 ein Doppeldublett (6,3 und 1,1 Hz; 3H) bei 1,80 ppm sowie die Signale zweier olefinischer Protonen zwischen 5,80 ppm und 6,20 ppm erkennbar. Aus der Analyse der Kopplungskonstanten des Spektrums wie auch aus 2D-¹H-Cosy-Spektren (Abbildung 28) geht hervor, daß obiges Methyldublett mit der Signalgruppe der olefinischen Protonen zwischen 5,80 ppm und 6,20 ppm koppelt. Demnach sollte in 4/2 die R-SS-CH₂-CH₂-CH₃ Gruppe der Verbindungen 4/1 und 4/3 durch eine R-SS-CH=CH-CH₃ Gruppe ersetzt sein.

Somit kommt beiden Verbindungen der Probe 4/2 folgende Grundstruktur zu:



Eine genaue Analyse der Mischspektren liefert den Beweis für das Vorliegen zweier Komponenten ("4/2 A" und "4/2 B"). Außerdem erlaubt sie das Mischungsverhältnis, die Zuordnung der Signale zu 4/2 A und 4/2 B sowie die Doppelbindungskonfigurationen anzugeben (s. Abb. 29 und 30). Das Vorliegen eines Gemisches ist am deutlichsten an den Signalen der Protonen an den C-Atomen in 5-Stellung erkennbar (Abb. 29)

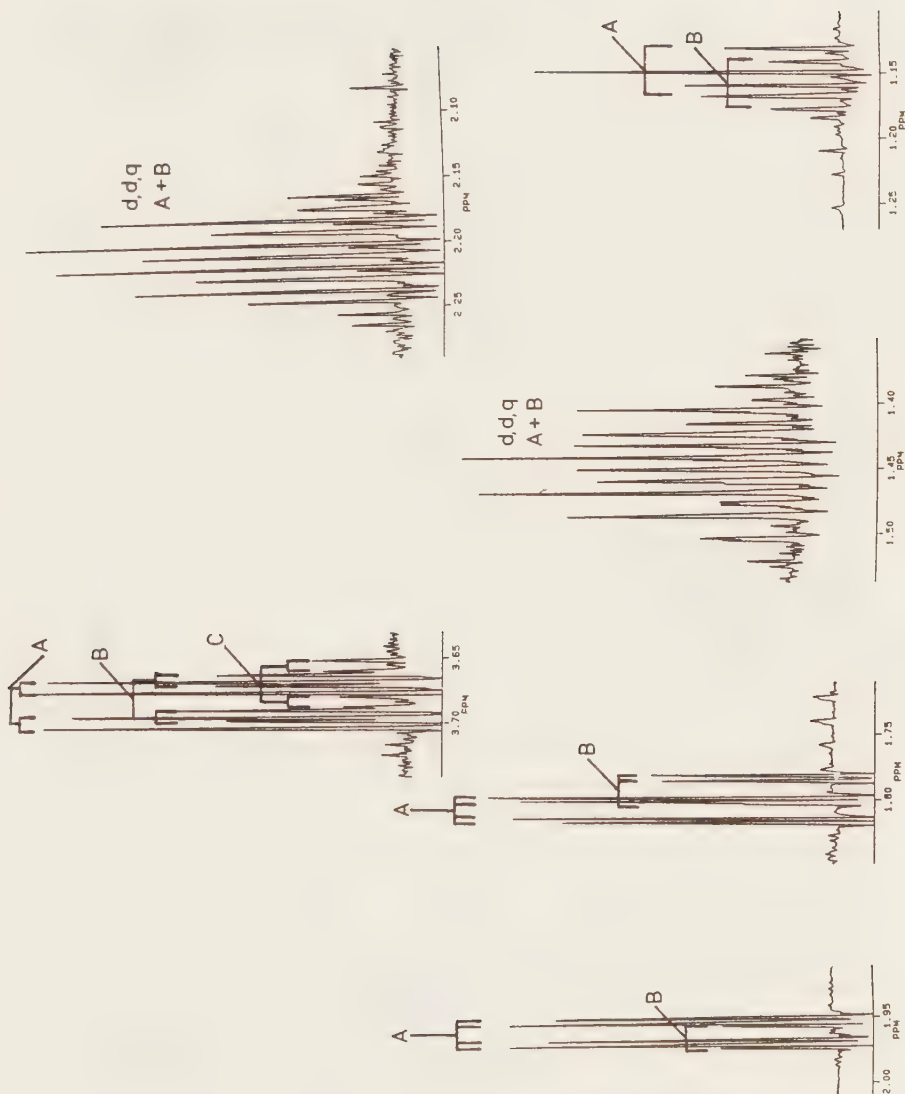


Abb. 29: Ausschnitte aus dem 400 MHz ^1H -NMR-Spektrum (Aliphatenbereich, gedehnt) von 4/2; Signalzuordnung zu 4/1, 4/2-A und 4/2 B

Man erkennt bei ca. 3,7 ppm drei Doppeldoublets A, B und C. Die Signale C stammen von der Verunreinigung durch Substanz 4/1. Die Doppeldoublets A und B beweisen das Vorliegen der beiden Komponenten 4/2 A und 4/2 B im Verhältnis von etwa 2:1. Die Signale der R-SS-CH=CH-CH₃ Methylprotonen bei ca. 1,8 ppm lassen ebenso wie die Methyltripletts bei ca. 1,1 ppm der Propylgruppen die Mischungsnatur von 4/2 erkennen. Die Quartetts von Doppeldoublets der beiden anisotropen Methylenprotonen beider Verbindungen bei ca. 1,45 ppm und 2,20 ppm sind überlagert. Eine sichere Zuordnung einzelner Signale der entstehenden Multipletts war daher nicht möglich.

Aufwendiger ist die Interpretation der Signale der olefinischen Protonen (s. Abb. 30).

Verglichen mit den Resonanzlagen der Protonen der trans-Doppelbindungen an Sulfoxidstrukturen zwischen 6,33 ppm und 6,55 ppm (vgl. Verbindungen 4/1 und 4/3) sind die Signale der zwei olefinischen Protonen in 4/2 zwischen 5,80 ppm und 6,15 ppm weniger stark entschirmt. Dies liefert ein weiteres Argument für das Vorliegen von Protonen an Doppelbindungen in Nachbarschaft zu einer - im Vergleich zur Sulfoxidstruktur - weniger elektronenziehenden Disulfidbrücke. Die am stärksten abgeschirmte Signalgruppe bei 5,82 ppm zeigt Aufspaltungen in Quartetts eines Doublets mit 6,9 und 9,2 Hz. Aufgrund der Kopplung mit der Methylgruppe in Stellung 10 sind diese Signale dem Proton am C-Atom 9 der - nach der Integration des Spektrums - geringer konzentrierten Komponente 4/2 B zuzuordnen. Die Doubletaufspaltung mit 9,2 Hz zeigt cis-Konfiguration der 8:9 Doppelbindung in Substanz 4/2 B an. Die Signale beider Quartetts des Systems haben ähnliche Intensitäten, d.h. daß die Protonen der cis-Doppelbindung kein A,B- sondern ein A,X-System bilden. Das andere Proton der 8:9 cis-Doppelbindung der Verbindung 4/2 B geht bei 6,16 ppm in Resonanz und zeigt die erwartete Aufspaltung in Quartetts eines Doublets mit 1,6 Hz (Fernkopplung) und 9,2 Hz.

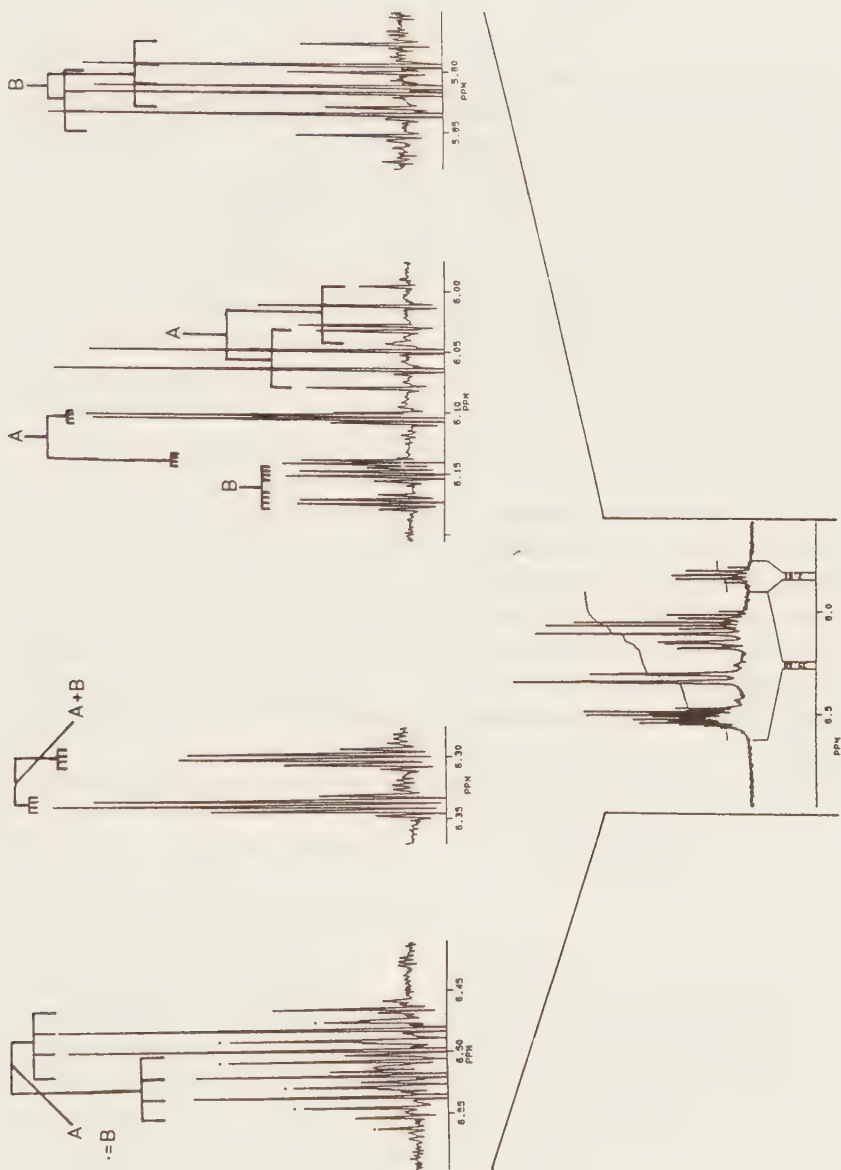


Abb. 30: ^1H -NMR-Signale der olefinischen Protonen von 4/2 bei 400 MHz mit Signalzuordnung zu Substanz 4/2 A und 4/2 B (ungedehnt und gedehnt)

Die verbleibenden Signale zwischen ca. 6,0 ppm und 6,16 ppm stammen von den Protonen einer trans-Doppelbindung in Nachbarschaft zur Disulfidbrücke der Hauptkomponente 4/2 A. Beide Protonen bilden ein A,B-System. Ihre Signale zeigen jeweils Aufspaltungen in ein Quartett eines Dubletts mit 1,3 und 14,5 Hz (Proton am C 8) bzw. 6,3 und 14,5 Hz (Proton am C 9). Die Signale zwischen etwa 6,3 ppm und 6,6 ppm stammen von Protonen an trans-Doppelbindungen in Nachbarschaft zur Sulfioxidstruktur beider Mischungskomponenten. Dabei unterscheiden sich die chemischen Verschiebungen der Protonen am C 2 in beiden Komponenten um 3,5 Hz (=0,009 ppm), sodaß auch hier die Zuordnung der Signale möglich war (s. Abb. 30). Das Gesamtintegral der Signale der Protonen in 2-Stellung beider Komponenten entspricht dem Gesamtintegral der Quartetts von Dubletts (1,2 und 15,1 Hz) bei 6,31 ppm. In letzteren Signalen sind die Resonanzen der Protonen an den C-Atomen 3 beider Komponenten überlagert. Damit ist bewiesen, daß 4/2 eine Mischung der beiden folgenden Verbindungen darstellt:
Verbindung 4/2 A (Hauptkomponente) ist:

trans,trans-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2,8-decadien-4-S-oxid

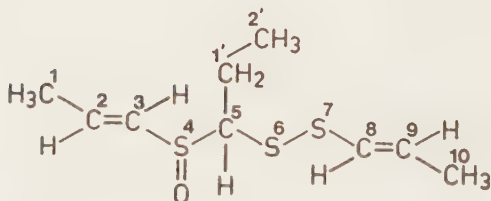


Abb. 31: Strukturformel von 4/2 A

Verbindung 4/2 B ist:

trans,cis-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2,8-decadien-4-S-oxid

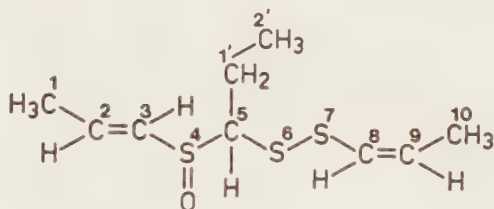
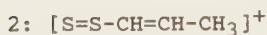
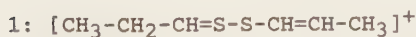


Abb. 32: Strukturformel von 4/2 B

Die Verbindungen 4/2 A und 4/2 B unterscheiden sich somit nur in der Konfiguration der Doppelbindung zwischen C8 und C9. Es muß sich in beiden Fällen um in 4-Stellung oxidierte Moleküle handeln, da sonst größere Unterschiede zwischen den chemischen Verschiebungen der olefinischen Protonen zu erwarten gewesen wären. Zudem wäre diese Stellungsisomerie im Massenspektrum nachzuweisen. Beide Verbindungen weisen analog zu den Verbindungen 4/1 und 4/3 zwei Asymmetriezentren auf. Deren Konfiguration soll unten diskutiert werden.

III.3.4.3.2. Weitere Informationen aus dem Massenspektrum von 4/2:

Die CI- und EI-Massenspektren von 4/2 stehen in Einklang mit den Strukturen der Mischungskomponenten 4/2 A und 4/2 B. Charakteristische Fragmente zeigen sich in CI- und EI-Massenspektren bei m/e 147 und m/e 105, also jeweils um zwei Masseneinheiten niedriger als bei den Verbindungen 4/1 und 4/3. Entsprechend der dort getroffenen Zuordnung stammt der Massenpeak bei m/e 147 vom Fragment 1, wogegen der Peak bei m/e 105 dem Fragment 2 zuzuordnen ist:



III.3.4.4. Verbindung 4/4

III.3.4.4.1. Hochfeld NMR:

Die Hochfeld ^1H -NMR-Spektren zeigten, daß auch 4/4 ein Gemisch aus zwei Komponenten 4/4 A und 4/4 B darstellte. Aus den Mischspektren konnten die Strukturen der Komponenten abgeleitet werden. Eine chromatographischen Trennung von 4/4 A und 4/4 B gelang nicht.

Die im ^1H -NMR-Spektrum von Probe 4/4 auftretenden Signalgruppen waren den im Spektrum von Substanz 4/2 beobachteten sehr ähnlich. Größere Unterschiede in der chemischen Verschiebung traten nur bei dem Proton am asymmetrischen C-Atom 5, bei Proton 1'a sowie bei dem olefinischen Proton am C-Atom 3 auf (s. Tab. 8). Bei gleichem Molekulargewicht war daher mit Verbindungen zu rechnen, die zu 4/2 A und B strukturell eng verwandt waren.

Das Vorliegen eines Gemisches war wiederum am deutlichsten an den Doppeldubletts des jeweiligen Protons zwischen Sulfoxid- und Disulfidstruktur sowie an den Methyltripletts der n-Propylgruppe erkennbar. Das Verhältnis 4/4 A zu 4/4 B betrug etwa 2:1.

Die Kopplungskonstante der olefinischen Protonen in Nachbarschaft zu der Disulfidbrücke zeigt mit 9,2 Hz für die 8:9 Doppelbindung der geringer konzentrierten Verbindung 4/4 B wieder cis-Konfiguration an. Ebenso sind, wie in 4/2 A und B, trans-Konfigurationen für die Doppelbindungen beider Komponenten zwischen C2 und C3 erkennbar (Kopplungskonstante jeweils 15,1 Hz). Die Signale beider Protonen der zur Disulfidbrücke benachbarten Doppelbindung der Hauptkomponente 4/4 A bilden im δ -Bereich 6,02-6,07 ppm* ein System höherer Ordnung. Die Konfiguration dieser Doppelbindung kann aus dem Spektrum nicht entnommen werden. Vergleich des Spektrums mit dem von Substanz 4/2 läßt allerdings eine trans-Konfiguration der Doppelbindung

*im 300 MHz Spektrum

wahrscheinlicher erscheinen. Zudem unterscheiden sich 4/2 A und B und 4/4 A und B lediglich in der Konfiguration der 8:9 Doppelbindung und der räumlichen Anordnung an beiden Asymmetriezentren. Es sind also bei zwei möglichen Diastereomerenreihen und zwei möglichen Doppelbindungskonfigurationen nur vier Strukturen möglich. 4/4 A ist nach NMR-Daten und chromatographischem Verhalten von 4/2 A und B und 4/4 B verschieden. Die Substanz muß demnach mit 4/4 B identische räumliche Anordnung an den Asymmetriezentren und von 4/4 B abweichende 8:9 Doppelbindungskonfiguration aufweisen. Somit kommen den Verbindungen in 4/4 folgende Strukturen zu:
Verbindung 4/4 A (Hauptkomponente) ist:

trans,trans-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2,8-decadien-4-S-oxid

Verbindung 4/4 B ist:

trans,cis-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2,8-decadien-4-S-oxid

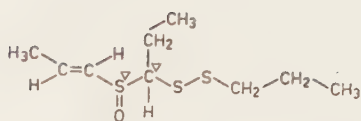
Die Verbindungen 4/4 A und 4/4 B sind diastereomer zu 4/2 A und 4/2 B.

V.4.3.4.2. Weitere Informationen aus dem Massenspektrum von 4/4:

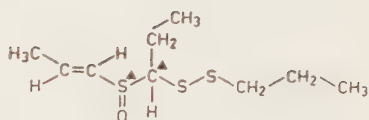
Die CI- und EI-Massenspektren von 4/4 sind in Einklang mit den oben angegebenen Strukturen. Es erscheinen die aus den Spektren von 4/2 bekannten charakteristischen Massenpeaks bei m/e 237 ($[M+H]^+$), m/e 147 und m/e 105 (Zuordnung siehe 4/2).

III.4. Übersicht über die aus Fraktion II/4 isolierten Verbindungen:

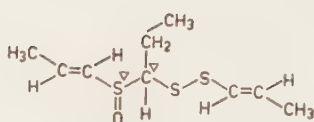
Abbildung 33 zeigt die Formelbilder der Verbindungen 4/1 bis 4/4 B, Tabelle 8 die chemischen Verschiebungen der Protonen der Verbindungen im Vergleich.



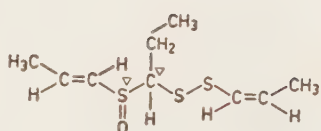
4/1



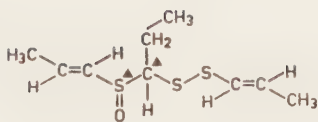
4/3



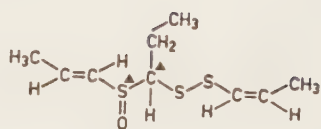
4/2 A



4/2 B



4/4 A



4/4 B

Abb. 33: Strukturen der Verbindungen 4/1 bis 4/4 B

Protonen an C	1	2	3	5	1'a	1'b	2'	8	9	10
Verb. <u>4/1</u>	1,97	6,51	6,33	3,68	1,42	2,20	1,17	2,78	1,73	1,01
Verb. <u>4/3</u>	1,97	6,55	6,44	3,48	1,89	2,27	1,14	2,73	1,71	1,00
Verb. <u>4/2 A</u>	1,96	6,51	6,32	3,69	1,45	2,21	1,15	6,12	6,04	1,81
Verb. <u>4/2 B</u>	1,96	6,52	6,32	3,68	1,45	2,21	1,16	6,16	5,82	1,79
Verb. <u>4/4 A</u>	1,96	6,56	6,44	3,52	1,90	2,26	1,13	6,1*	6,1*	1,79
Verb. <u>4/4 B</u>	1,96	6,57	6,46	3,50	1,90	2,28	1,14	6,11	5,79	1,79

Die mit * gekennzeichneten Resonanzen bilden ein System höherer Ordnung und sind daher in ihrer Lage nicht exakter zu bestimmen

Tab. 8: Chemische Verschiebungen der Protonen der Verbindungen 4/1, 4/3, 4/2 A/B und 4/4 A/B bei 300/360/400 MHz

Die Substanzpaare 4/2 A-4/2 B und 4/4 A-4/4 B unterscheiden sich jeweils in der Konfiguration der 8:9 Doppelbindung. Bei 4/1-4/3, 4/2 A-4/4 A und 4/2 B-4/4 B handelt es sich jeweils um Diastereomerenpaare. Die Zuordnung zu einer stereochemischen Reihe (dd oder ll bzw. dl oder ld) ist anhand der chemischen Verschiebung der Protonen an den C-Atomen 3, 5 und 1' möglich. Die Differenzen zwischen beiden Reihen liegen bei 0,1 ppm (Proton an C3), 0,2 ppm (Proton an C5) und 0,4-0,5 ppm (Proton 1'a). Die tatsächliche Konfiguration der Substanzen ist anhand der vorliegenden Daten nicht zu klären.

Die Verbindungen 4/1 bis 4/4 B sind bisher nicht beschriebene Naturstoffe.

Aus Allium sativum L. waren bisher nur (E und Z)-4,5,9-Trithiadodeca-1,6,11-trien-9-oxid [(E,Z)-Ajoen] isoliert worden [52].

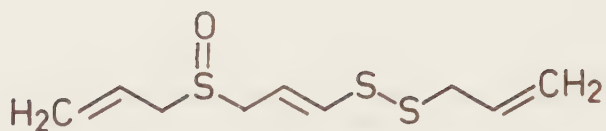


Abb. 34: Struktur von E-Ajoen

Die Ajoene entstehen, wie in Abbildung 1 gezeigt, als Folgeprodukte des instabilen Hauptthiosulfinates Allicin durch eine Kondensationsreaktion.

Ein ähnlicher Bildungsweg aus den in Allium cepa L. nachgewiesenen Thiosulfinaten scheint auch für obige "Cepaene" möglich.

IV. Synthese von Thiosulfinsäureestern:

In den antiasthmatisch wirksamen Fraktionen der Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft waren neben Dipropylthiosulfinat ausschließlich α,β -ungesättigte Thiosulfinate als Wirksubstanzen identifiziert worden. Um Aussagen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen in der Klasse der Thiosulfinate zu ermöglichen, sollten verschieden substituierte Vetreter dieser Substanzgruppe auf Asthmaschutzwirkung untersucht werden.

Darüberhinaus sollte die Aktivität der Substanzen in weiteren in vitro und in vivo Modellen überprüft und Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten aufgestellt werden.

Dazu war es notwendig, verschieden substituierte Thiosulfinate im Grammaßstab zur Verfügung zu stellen. Dies war nur durch die Synthese der entsprechenden Verbindungen möglich.

IV.1. Symmetrisch substituierte Thiosulfinate:

Man erhält symmetrisch substituierte Thiosulfinate nach SMALL u. Mitarb. [55] durch Oxidation der entsprechenden Disulfide mit einer äquimolaren Menge 3-Chlorperbenzoesäure bei 0°C in Dichlormethan.

Ausgehend von Dimethyldisulfid, Dipropyldisulfid, Diallyldisulfid und Diphenyldisulfid haben wir Dimethylthiosulfinat, Dipropylthiosulfinat, Diallylthiosulfinat und Diphenylthiosulfinat hergestellt.

Als Nebenprodukte entstehen bei dieser Oxidation jeweils geringe Mengen der entsprechenden Thiosulfonate. Diese Nebenreaktion kann durch Einsatz einer geringeren (ca. 90%) als der berechneten Menge Oxidationsmittel vermindert werden. Die Reinigung des Produktes von Nebenprodukten und nicht umgesetztem Disulfid erfolgte auf chromatographischem Wege entweder mittels Chromatotron oder durch Flash-Chromatographie. Die Produkte wurden mit HPLC auf Reinheit überprüft und durch Massen- und Kernresonanzspektroskopie identifiziert.

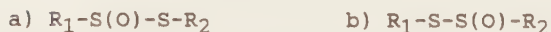
- 1) Dimethyl- und Dipropylthiosulfinat sind farblose, leicht bewegliche Öle von unangenehmem, stechendem Geruch. Die Ausbeuten lagen bei 50% (Dimethylthiosulfinat) und 65% (Dipropylthiosulfinat) der Theorie.
- 2) Diphenylthiosulfinat ist leicht gelb gefärbt, kristallin und riecht typisch. Die Substanz wurde in 75%-iger Ausbeute erhalten.
- 3) Diallylthiosulfinat (Allicin), ein instabiles, in reiner Form farbloses Öl von typischem Knoblauchgeruch wurde bei obigem Vorgehen nur als Nebenprodukt in ca. 10%-iger Ausbeute erhalten.

Die Struktur des Hauptprodukts der Reaktion konnte nicht 100%-ig geklärt werden. Spektroskopische Daten zeigten, daß es sich vermutlich um ein Dimer, entstanden aus einem Molekül Allicin und einem Molekül Diallyldisulfid, handelt. Die Verknüpfung sollte dabei nicht über eine C-C-Bindung sondern eine -S-S-Brücke erfolgt sein.

Da die Verbindung ebenso wie Allicin instabil ist und ihre in vitro Wirksamkeit nicht höher war als die Aktivität von Allicin, wurde die Substanz nicht weiter bearbeitet.

IV.2. Asymmetrisch substituierte Thiosulfinate:

Asymmetrisch substituierte Thiosulfinate sind in analoger Weise durch Oxidation von asymmetrischen Disulfiden zugänglich. Dabei wird ein Gemisch zweier stellungsisomerer Produkte erhalten:



Ein selektiver Syntheseweg für jeweils ein Isomer wurde von BLOCK u. Mitarb. [51] angegeben:

Zunächst wird ein symmetrisches Disulfid mit Wasserstoffperoxid bei 0°C zum Thiosulfinat oxidiert. Anschließend erhält man durch Chlorinolyse mit einem Äquivalent Chlor das entsprechende Sulfinylchlorid, das mit einem Mercaptan zum asymmetrisch substituierten Thiosulfinat umgesetzt werden kann.

Weniger aufwendig erschien uns die Oxidation eines asymmetrischen Disulfids und anschließende Trennung des entstandenen Isomerengemisches.

Die Gewinnung asymmetrischer Disulfide kann z.B. erfolgen durch:

- 1) Umsetzung eines Thiosulfonates mit einem Thiophenol oder Mercaptan in wasserfreiem Diethylether unter Pyridinzusatz [56].
- 2) Oxidation einer äquimolaren Mischung zweier Mercaptane z.B. mit Jod. Dabei entstehen allerdings neben dem asymmetrischen auch beide symmetrischen Disulfide [57].
- 3) Disproportionierung eines symmetrisch gebauten Disulfids mit einem Mercaptan in alkalischer, alkoholischer Lösung [57].

Für die unter 3) angegebene Umsetzung kann die nachstehende allgemeine Reaktionsgleichung geschrieben werden:



Diese Gleichgewichtsreaktion kann bei Verwendung von Dimethyldisulfid als Ausgangsdisulfid durch Abdestillieren von Methylmercaptan (Sdp. 6°C) nach der rechten Seite verschoben werden.

Wir wählten deshalb diese Methode, um asymmetrische, methylsubstituierte Disulfide darzustellen.

Durch Umsetzung von Dimethyldisulfid mit Thiophenol (Ansatz 1) bzw. 1-Propanthiol (Ansatz 2) waren Methylphenyldisulfid (Ansatz 1) und Methylpropyldisulfid (Ansatz 2) zugänglich. Neben den asymmetrischen Disulfiden bildeten sich jeweils auch kleinere Mengen des unerwünschten symmetrischen Disulfids. Die Abtrennung der symmetrisch aufgebauten Produkte konnte entweder auf der Stufe der Disulfide oder nach deren Oxidation

auf der Stufe der Thiosulfinate erfolgen.

Zur DC-Auftrennung von Disulfiden auf Kieselgel eignet sich n-Hexan als Laufmittel. Die Unterschiede im Rf-Wert waren zwischen symmetrischen und asymmetrischen Disulfiden gering. Der Rf-Wert von Methylphenyldisulfid lag bei 0,38, der von Diphenyldisulfid bei 0,32. Da später ohnehin eine chromatographische Trennung der Thiosulfinate von Nebenprodukten und nicht umgesetztem Disulfid sowie evtl. Isomerentrennung unumgänglich war, wurde die Mischung der erhaltenen symmetrischen und asymmetrischen Disulfide oxidiert.

Bei der Oxidation von Ansatz 1 wurde ein Gemisch aus Diphenylthiosulfinat, Methylphenylthiosulfinat, Phenylmethylthiosulfinat, nicht umgesetzten Disulfiden und kleinen Mengen der Thiosulfonate erhalten (s. Abb. 35).

Die Gewinnung von reinem Methylphenylthiosulfinat und Phenylmethylthiosulfinat erfolgte durch MPLC an Kieselgel mit Dichlormethan als Elutionsmittel.

Bei der Aufarbeitung von Ansatz 2 konnte durch Verwendung von n-Hexan/Ethylacetat (10:2) als Elutionsmittel zwar Dipropylthiosulfinat von den asymmetrisch substituierten Thiosulfinaten abgetrennt werden, doch zeigten die Isomere Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat einen so geringen Rf-Unterschied, daß auf eine Trennung verzichtet werden mußte.

Die Synthese von α,β -ungesättigten Thiosulfinaten wurde nicht versucht. Sie ist wegen der dazu notwendigen Synthese entsprechender ungesättigter Mercaptane oder Disulfide schwierig. Weiterhin ist bei der Oxidation dieser Disulfide aufgrund der Reaktivität der entstehenden ungesättigten Thiosulfinate mit Folgereaktionen zu rechnen.

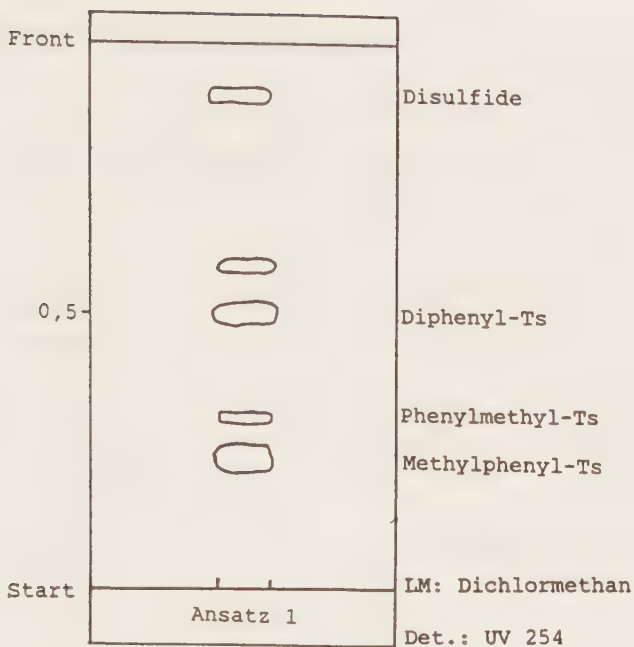
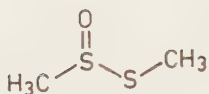
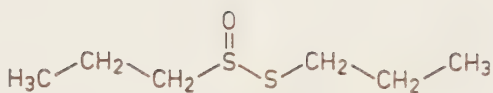


Abb. 35: Dünnschichtchromatogramm von Ansatz 1 nach Oxidation

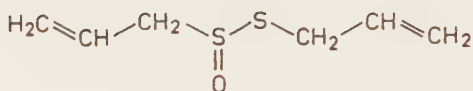
Abbildung 36 zeigt die Strukturformeln der für die pharmakologische Untersuchung synthetisierten Thiosulfinsäureester.



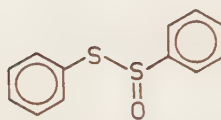
Dimethyl-Ts



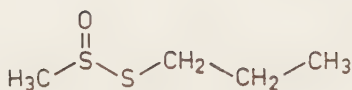
Dipropyl-Ts



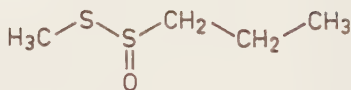
Diallyl-Ts
(Allicin)



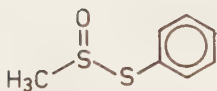
Diphenyl-Ts



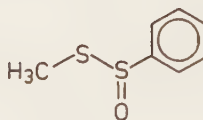
Methylpropyl-Ts



Propylmethyl-Ts



Methylphenyl-Ts



Phenylmethyl-Ts

Abb. 36: Strukturformeln der synthetisierten Thiosulfinate

V. Weitere Untersuchungen mit Zwiebelextrakten

V.1. Identifizierung weiterer Extraktkomponenten

V.1.1. Nachweis von Dimethylthiosulfinat mittels HPLC:

Im HPLC-Chromatogramm des Zwiebelextraktes erschien bei $R_t=1,7$ min (System 1) ein prominenter Peak, der mit von uns synthetisiertem Dimethylthiosulfinat retentionsgleich war. Das UV-Spektrum des Extraktpeaks stimmte mit dem on-line aufgenommenen UV-Spektrum von Dimethylthiosulfinat überein. Beim Überspritzen fielen Extraktpeak und der Peak von Dimethylthiosulfinat zusammen. Damit ist Dimethylthiosulfinat als Inhaltsstoff des Zwiebelextraktes nachgewiesen.

V.1.2. Nachweis von Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat mittels HPLC:

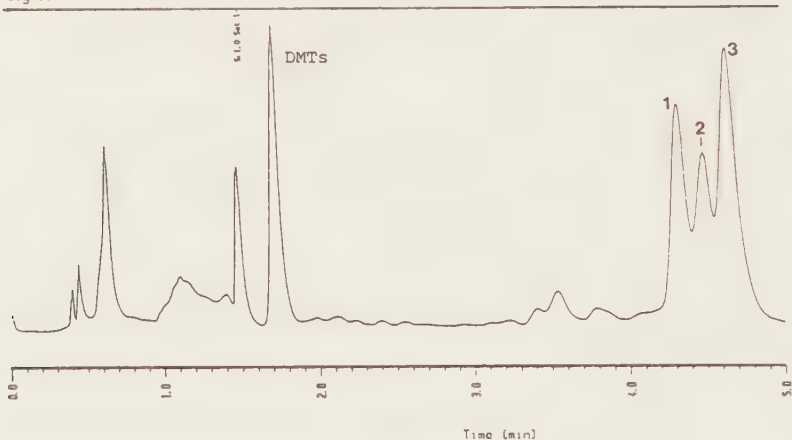
Im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 37) der frisch hergestellten Chloroformausschüttelung des Saftes einer gelben Varietät von Allium cepa L. dominierte neben dem Peak des Dimethylthiosulfinats ($R_t=1,70$ min) eine aus drei Peaks bestehende Peakgruppe, die zwischen 4 und 5 min eluiert wurde ($R_t=4,32/4,49/4,65$ min). Die Peaks 1 und 2 waren retentionsgleich mit den isolierten Verbindungen trans- und cis- Methyl-1-propenylthiosulfinat (Verbindungen 1 und 2). Das on-line aufgenommene UV-Spektrum von Peak 2 wich allerdings vom Spektrum der isolierten Verbindung 2 ab. Ein Vergleich der an der auf- und absteigenden Flanke von Peak 2 aufgezeichneten UV-Spektren zeigte, daß Peak 2 nicht einheitlich war.

Aufgrund des sehr ähnlichen chromatographischen Verhaltens mußte es sich bei der Substanz von Peak 3 und bei der mit 2 überlagerten Verbindung um strukturverwandte Thiosulfinate handeln.

File: ALCEP
 Date: 09/03/1987
 Inj. Time: 19:59
 Attm (mAU): 174.4 (149.5)
 Zero: 10
 Signal: At 1.0

Wavelength (nm)
 1. 200. 4
 2. 220. 4
 3. 250. 4
 4. 280. 4
 5. 300. 4
 6. 320. 4
 7. 350. 50
 8. 410. 4

hp 1040A



File	ALCEP	ALCEP	ALCEP	ALCEP	hp 1040A
Date	09/03/1987	09/03/1987	09/03/1987	09/03/1987	
Spectrum (nm)	1. 7118	4. 3208	4. 4915	4. 5487	
Reference (nm)	2. 6945	5. 0127	5. 0127	5. 0127	
Attm (mAU)	194.4	127.9	98.0	162.6	
Absorbance (mAU) (nm)	166.6 (199/ 2)	109.6 (199/ 2)	84.0 (199/ 2)	139.4 (199/ 2)	

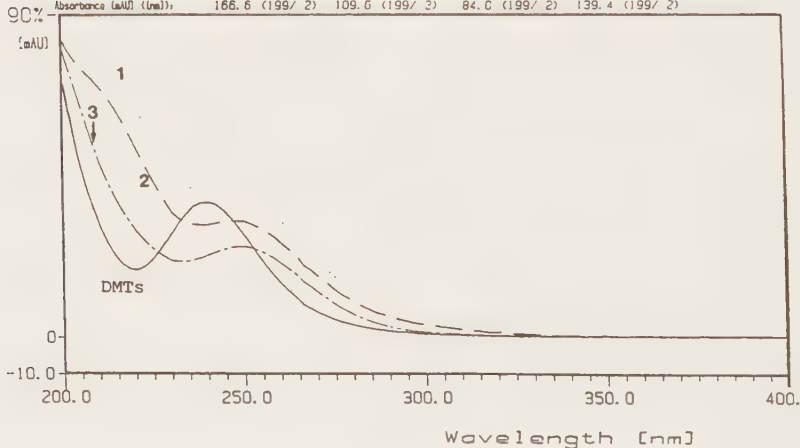


Abb. 37: Gedehnter Ausschnitt aus dem HPLC-Chromatogramm von frischem Zwiebelextrakt (System 2) mit den UV-Spektren der Peaks 1-3 und von Dimethylthiosulfinat

Strukturhinweise für diese Thiosulfinate ergaben sich aus den genuin in Allium cepa L. vorliegenden Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxiden. Neben Dimethylthiosulfinat, Dipropylthiosulfinat, Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat und n-Propyl-cis/trans-1-propenyl-thiosulfinat sollten aus den Cysteinderivaten Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat sowie u.U. auch α,β -ungesättigte Thiosulfinate mit der Teilstruktur



gebildet werden.

Im Polaritätsbereich der Substanzen 1 und 2 waren Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat zu erwarten. Deshalb verglichen wir das bei der Synthese erhaltene Isomerengemisch mit Methyl-trans/cis-1-propenylthiosulfinat.

Die bestmögliche Auftrennung der Substanzen 1 und 2 wie auch von Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat wurde in der RP-HPLC bei isokratischer Elution mit 15% Acetonitril (HPLC-System 3) erreicht. Wir erhielten Retentionszeiten von 6,63 min für Substanz 1, 6,97 min für Substanz 2, 7,05 und 7,47 min für Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat.

Die UV-Spektren von Thiosulfinaten mit gesättigten Substituenten unterscheiden sich in charakteristischer Weise von den Spektren der α,β -ungesättigten Verbindungen.

Dabei ist insbesondere die unterschiedliche Lage und Ausprägung der Absorptionsminima auffällig (s. Abb. 38).

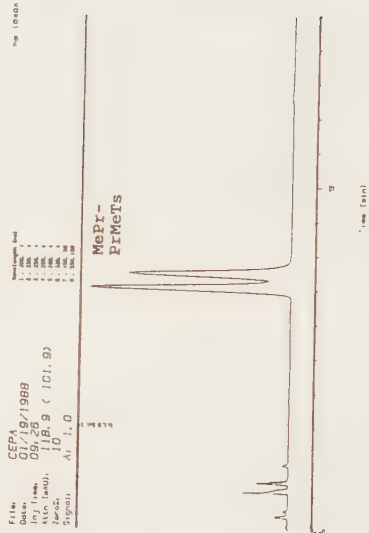
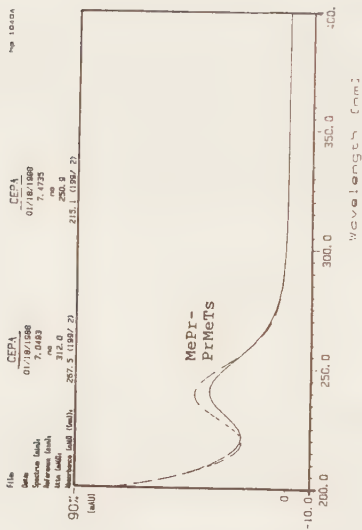
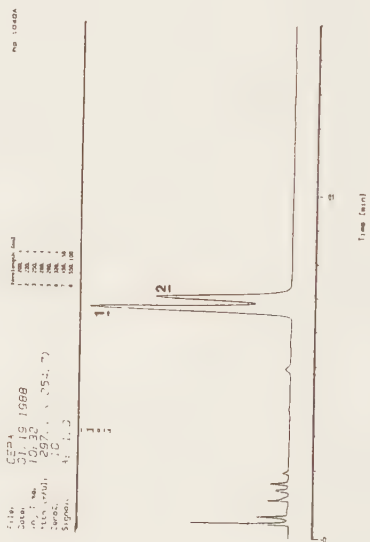
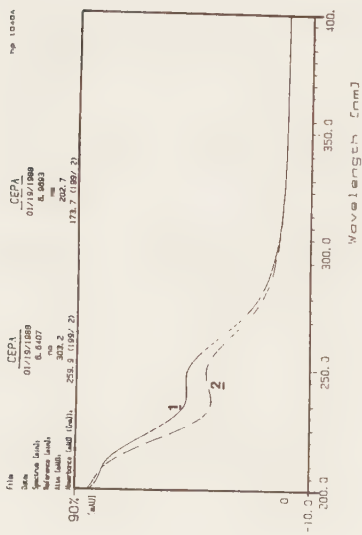


Abb. 38: HPLC-Chromatogramme (System 3) von Substanz 1 und 2 sowie Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfat mit on-line aufgenommenen UV-Spektren

Beide Proben aus Abbildung 38 wurden überspritzt. Abbildung 39 zeigt das erhaltene Chromatogramm (Peaks 1', 2' und 3') und die Intensitätsverhältnisse der Detektorsignale dieser Peaks bei 200 und 250 nm.

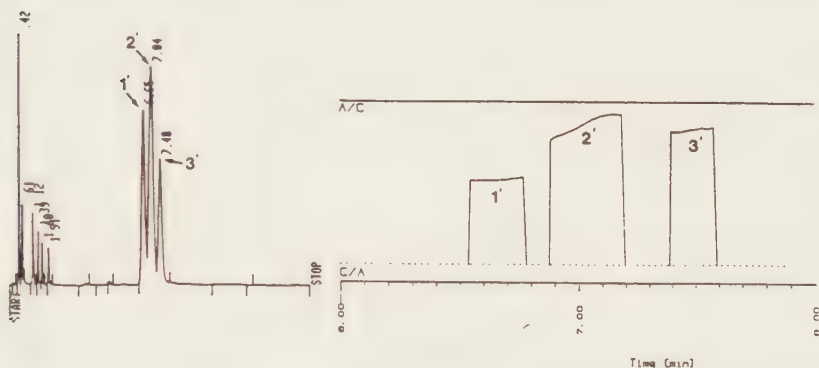


Abb. 39: HPLC-Chromatogramm (System 3) der Mischung der Proben aus Abbildung 38

Die Peaks 2 und 3, die in den Einzelproben nach 6,97 min und 7,05 min eluiert worden waren, fielen nun in einem Peak der Retentionszeit 7,04 min zusammen. Die graphische Darstellung der Signalverhältnisse zeigte durch nicht horizontalen Verlauf an, daß Peak 2' im Gegensatz zu Peak 1' und 3' nicht einheitlich war.

Abbildung 40 zeigt das Mischspektrum von Peak 2' und die Spektren der zusammenfallenden Substanzen.

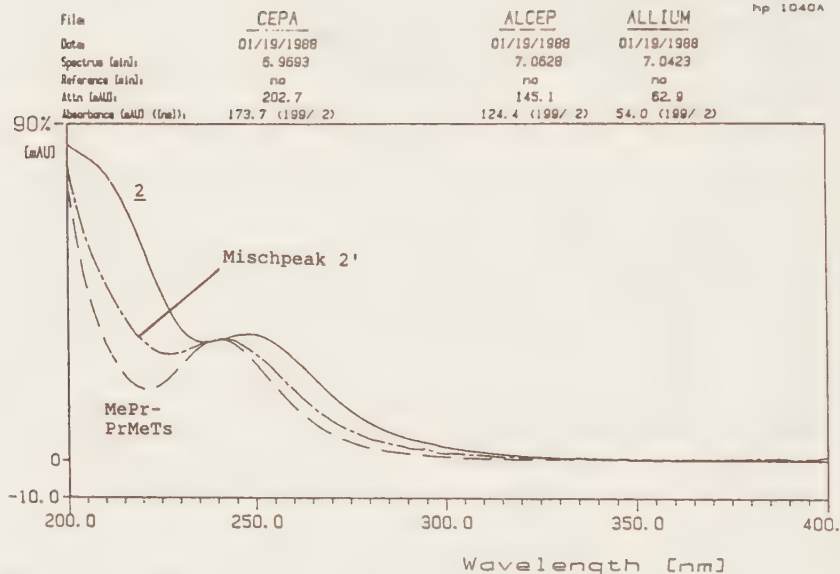


Abb. 40: UV-Spektren von Substanz 2 und Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat sowie von deren Mischung

Ein Gemisch aus den Substanzen 1, 2, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat ergab in der analytischen HPLC somit ebenfalls eine aus drei Peaks zusammengesetzte Peakgruppe, wie sie im Extrakt nachgewiesen worden war. Ein Vergleich der entsprechenden Retentionszeiten war jedoch nicht möglich, da der Extrakt im Gradientensystem 2, die Mischung der vier Reinsubstanzen dagegen bei isokratischer Elution (System 3) untersucht worden war.

Eine andere, bei -20°C gelagerte Extraktcharge wurde deshalb mit isokratischer Elution chromatographiert (System 4, Abbildung 41). Wir erhielten beim Extrakt im entsprechenden Bereich drei Peaks, die mit den Peaks der überspritzten Probe (s. Abb. 39) retentionsgleich waren.

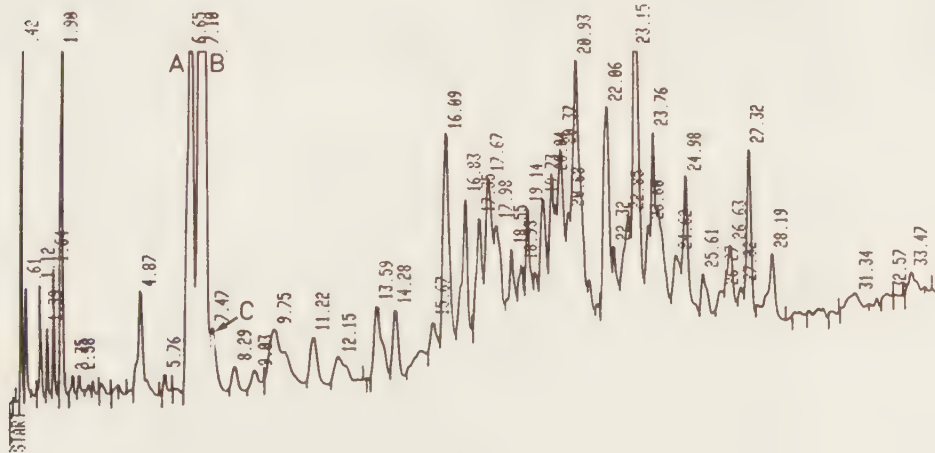
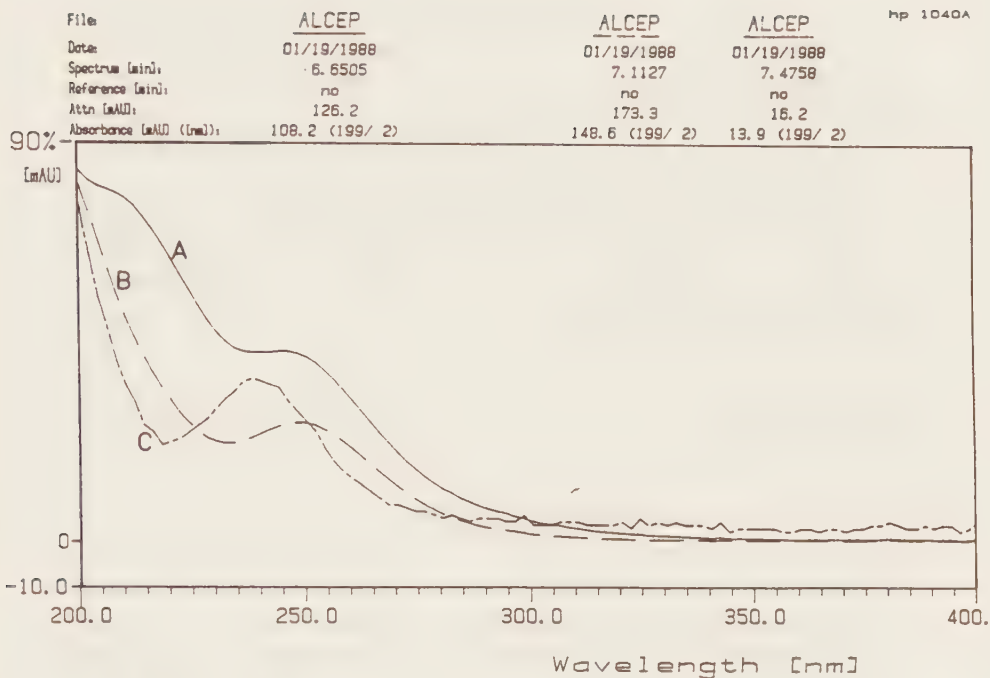


Abb. 41: HPLC-Chromatogramm (System 4) des gelagerten Extraktes

Das UV-Spektrum von Peak A entsprach dem der Substanz 1. Ebenso war das Spektrum des sehr niedrig konzentrierten Peaks C mit dem Spektrum des bei 7,47 min eluierten Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinats identisch.

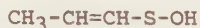
Im Peak B überlagerten sich Substanz 2 und ein Methylpropyl-Propylmethylthiosulfinat. Diese Überlagerung war durch den Vergleich der an der auf- und absteigenden Flanke aufgenommenen UV-Spektren erkennbar. Damit waren Methylpropylthiosulfinat und Propylmethylthiosulfinat als Bestandteile des Extraktes aus Allium cepa L. identifiziert.

Ob darüberhinaus α,β -ungesättigte Thiosulfinat mit der Teilstruktur



in geringen Konzentrationen in der oben diskutierten Peakgruppe des Extraktes vorliegen, konnte nicht geklärt werden.

Aus biosynthetischer Sicht ist mit dem Vorliegen von Substanzen dieses Typs zu rechnen. Die Bildung der im Extrakt nachgewiesenen α,β -ungesättigten Thiosulfin säureester erfolgt durch Kondensation von 1-Propensulfensäure



mit Methan- oder Propansulfensäure.

Aus diesen Sulfensäuren sollten auch die obigen α,β -ungesättigten Thiosulfinat gebildet werden.

Im Zuge der Isolierungsarbeiten waren Substanzen dieses Typs allerdings nicht aufgefunden worden. U.U. entziehen sie sich aufgrund zu geringer Stabilität der Isolierung.

Für das Vorliegen von cis- und trans-1-Propenylmethylthiosulfinat im frischen Extrakt und den schnellen Abbau dieser Substanzen auch bei $-20^{\circ}C$ sprechen Veränderungen der UV-Spektren und der Intensitätsverhältnisse der Peaks im Bereich der oben diskutierten Peakgruppe.

V.2. HPLC-Vergleich von Extrakten verschiedener Zwiebel-varietäten:

Verglichen wurden Zwiebelextrakte der weißen, gelben und roten Varietät der Ernte 1987. Die Zwiebeln wurden geschält, homogenisiert und nach 30 min abgenutscht. Der Saft wurde dreimal mit je einer äquivalenten Menge Dichlormethan ausgeschüttelt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert.

Bezogen auf die geschälte Droge wurden Extraktausbeuten von 0,016% bei der roten, 0,025% bei der gelben und 0,026% bei der weißen Varietät erhalten. Die Ausbeuteangaben sind Mittelwerte zweier Extraktionen.

Die Extrakte wurden durch Seppak-C18-Kartuschen filtriert und mittels HPLC untersucht. Die erhaltenen Chromatogramme waren nahezu identisch. Als Hauptinhaltsstoffe waren jeweils Dimethylthiosulfinat, Methyl-trans/cis-1-propenylthiosulfinat sowie Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat nachweisbar. Das bedeutet, daß grundsätzlich aus allen untersuchten Varietäten ein Extrakt erhalten wird, der die antiasthmatischen Wirksubstanzen enthält. Allerdings ist die Extraktausbeute bei der roten Varietät um 1/3 niedriger als bei der weißen und gelben Varietät.

V.3. Gehaltsbestimmung der Hauptthiosulfinat des Zwiebel-extraktes:

Thiosulfinat wurden bisher mit photometrischen Methoden quantitativ bestimmt. Die Methoden basieren entweder auf der Bestimmung der bei der Thiosulfinatbildung freigesetzten Brenztraubensäure [58] oder auf der Messung gefärbter Reaktionsprodukte der Thiosulfinat selbst [15,59].

Bei der Gehaltsbestimmung der Thiosulfinat in einem Extrakt werden durch diese Methoden alle Thiosulfinat erfaßt. Die Quantifizierung eines Thiosulfinates nach Isolierung durch präperative DC nach MICHAELLES [2] erhöht zwar die Selektivität der Bestimmung, es muß aber mit Substanzverlusten durch

Adsorption an Kieselgel und durch teilweisen Abbau der Substanzen während der Isolierung gerechnet werden. Zudem sind bei Extrakten aus Allium cepa L. die Thiosulfinatzonen mit anderen Substanzen überlagert, sodaß deren Isolierung durch präparative DC Probleme bereitet.

Wir verwendeten daher zur Gehaltsbestimmung der Hauptthiosulfinate eine HPLC-Methode mit externem Standard.

In allen von uns untersuchten Drogenchargen sind Dimethylthiosulfinat und Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat als Hauptwirksubstanzen der Zwiebelextrakte anzusehen.

Dimethylthiosulfinat ist im HPLC-Chromatogramm nicht mit einer anderen Substanz überlagert und kann selektiv quantifiziert werden. 10 Drogenchargen der gelben Varietät von Allium cepa L. aus der Ernte 1987 wurden untersucht. Der Gehalt an Dimethylthiosulfinat lag zwischen 4,0% und 7,4% (G/G).

Die Verbindungen 1 und 2 werden im HPLC-Chromatogramm von Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat überlagert. Deshalb bestimmten wir die Gesamtkonzentration aller vier Verbindungen berechnet als Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat. Das Isomerengemisch aus Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat ist aufgrund seiner größeren Stabilität besser als Standard geeignet als die ungesättigten Verbindungen 1 und 2.

Der Gehalt an 1, 2, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat schwankte in den untersuchten Chargen zwischen 12,4% und 26,1% (G/G). 6 der 10 untersuchten Extrakte wiesen einen Gehalt zwischen 18% und 21% auf.

Der tatsächliche Gesamtgehalt an diesen Substanzen liegt geringfügig niedriger, da bei ungesättigten Thiosulfinaten mit einem höheren molaren Absorptionkoeffizienten zu rechnen ist. Die Peaks der Substanzen 5, 6 und 7 werden in den HPLC-Chromatogrammen der Extrakte nicht genügend von den Nachbarpeaks abgetrennt, um eine Gehaltsbestimmung mittels HPLC zu ermöglichen. Eine Abschätzung zeigte allerdings, daß der Gesamtgehalt an 5, 6 und 7 in allen 10 untersuchten Chargen unter 10% des Gehaltes an 1, 2, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat lag.

Die Addition obiger Gehalte lieferte für die untersuchten Chloroformausschüttelungen aus Zwiebelsaft Gesamtthiosulfinatgehalte zwischen etwa 18% und 36%. Der mittlere Gehalt lag bei 27%.

V.4. Stabilitätsuntersuchungen mit Zwiebelextrakten:

Thiosulfinate sind allgemein instabile Verbindungen.

Die Abbaureaktionen können thermisch oder photochemisch ausgelöst werden. Sulfidische Verbindungen, Säuren und Basen wirken katalytisch [60,61].

Ein einfacher Abbauweg für Thiosulfinate ist die Disproportionierung zu Disulfid und Thiosulfonat. Die Bereitschaft zur Disproportionierung hängt von den Substituenten der Thiosulfinatfunktion ab. Bei 96°C weist z.B. reines Dimethylthiosulfinat eine Halbwertszeit von 7 min auf, während die Halbwertszeit von Di-*t*-butylthiosulfinat bei 148 min liegt [62].

Neben der Disproportionierung sind von BLOCK [51,63] eine Reihe von anderen Abbauwegen für Thiosulfinate beschrieben worden.

Man erhält demzufolge aus Thiosulfinaten bei verschiedenen Reaktionsbedingungen unterschiedliche Produktmuster.

Die Thiosulfinate in Extrakten aus *Allium*-Arten entstehen als Intermediärprodukte auf enzymatischem Wege bei Gewebeerstörung aus Alk(en)yl-L-cysteinsulfoxiden.

Unter drastischen Bedingungen, wie z.B. der Wasserdampfdestillation, werden die Thiosulfinate dann überwiegend zu sulfidischen Verbindungen umgesetzt. Unter mildereren Bedingungen wurden aus Allicin die Vinylthiine und die biologisch aktiven Ajoene erhalten (s. Abb. 1).

Die Thiosulfinate des Extraktes aus *Allium cepa* L. hatten sich im Zuge der Isolierungsarbeiten ebenfalls als instabil erwiesen:

- Durch die Abtrennung der Triterpene an RP-Material (siehe Seite 18) hatte sich der Gesamtgehalt des Extraktes an Methyl-*cis/trans*-1-propenylthiosulfinat und Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat um ca. 40% verringert.

- Die Trennung der Substanzen 1 und 2 durch präparativen HPLC war wegen deren mangelnder Stabilität nicht gelungen.
- Ein Versuch der Isolierung des Gemisches der Substanzen 1, 2, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat durch MPLC an RP-Material scheiterte aus demselben Grund.
- Bei der Lagerung von Extrakten, Fraktionen und isolierten Reinsubstanzen bei Raumtemperatur und +4°C waren Veränderungen im Thiosulfinatgehalt eingetreten. Bei -20°C und -70°C gelagerte Proben erschienen dagegen stabil.

Für eine evtl. therapeutische Anwendung war das Ausmaß der Instabilität der Wirksubstanzen zu klären und zu untersuchen, ob der Extrakt stabilisiert werden konnte.

Um systematische Stabilitätsuntersuchungen mit identischem Material durchführen zu können, stellten wir eine Extraktlösung der Konzentration 10mg/ml in Methanol her, die bei -70°C aufbewahrt wurde. Bei Verwendung von Methanol als Lösungsmittel kann die Testlösung direkt als Untersuchungslösung für die HPLC verwendet werden. Zudem sind die in Proben für die RP-HPLC unerwünschten Triterpene des Extraktes in Methanol bei -20°C schwer löslich und können nach Zentrifugation größtenteils abgetrennt werden.

Mit dieser Extraktlösung wurden

1. Langzeitlagerungsversuche bei verschiedenen Temperaturen und
2. Streßtests bei 37°C und 60°C durchgeführt.

zu 1: Die Proben der Extraktlösung wurden in dicht verschlossenen Zentrifugenschliffgläsern bei Raumtemperatur (20°C), im Kühlschrank bei +4°C sowie im Tiefkühlschrank bei -20°C und -70°C über einen Zeitraum von 190 Tagen gelagert. In der Lagertemperatur angemessenen Abständen wurden Proben gezogen und in der HPLC untersucht. Beobachtet wurden die Veränderungen des Extraktgehaltes an Dimethylthiosulfinat und der Mischung aus den Substanzen 1, 2 und Methylpropyl-/Propylmethyl-

thiosulfinat bezogen auf eine zu Beginn der Untersuchung chromatographierte Probe der Lösung. In Tabelle 9 sind die Gehalte an den oben angegebenen Substanzen nach den verschiedenen Lagerzeiten angegeben.

Lagerdauer (Tage)	2	7	14	21	49	120	190
bei 20°C							
Gehalt <u>1+2</u> und MP-/PM-TS (%)	98,4	88,0	64,3	58,5	51,3	27,4	16,5
Gehalt DM-TS (%)	100,0	95,7	88,1	79,2	73,5	49,3	14,4
bei 4°C							
Gehalt <u>1+2</u> und MP-/PM-TS (%)	n.b.	105,2	90,6	n.b.		85,7	1,3
Gehalt DM-TS (%)	n.b.	101,6	105,0	n.b.		114,4	118,2
bei -20°C							
Gehalt <u>1+2</u> und MP-/PM-TS (%)	n.b.					91,0	95,0
Gehalt DM-TS (%)	n.b.					102,6	105,9
bei -70°C							
Gehalt <u>1+2</u> und MP-/PM-TS (%)	n.b.					98,0	106,0
Gehalt DM-TS						104,7	105,0

n.b.=nicht bestimmt;

1+2,MP-/PM-Ts = Mischung aus Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat und Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat;

DM-Ts = Dimethylthiosulfinat

die %-Werte sind aus dem Durchschnitt je zweier Einspritzungen berechnet;

Tab. 9: Ergebnisse des Langzeitlagerungsversuchs

Bei Raumtemperatur (20°C) tritt Abbau der Wirksubstanzen ein. Dabei ist Dimethylthiosulfinat stabiler als die Mischung der 4 weiteren beobachteten Thiosulfinat. Bereits nach drei Wochen ist der Gehalt an den Substanzen 1, 2, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat um etwa 40% und der Gehalt an Dimethylthiosulfinat um etwa 20% abgesunken. Bei +4°C geht der Abbau von 1, 2, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat wesentlich langsamer vor sich. Nach 27 Wochen liegt der Gehalt noch bei über 80%. Der Gehalt an Dimethylthiosulfinat nimmt bei +4°C überraschenderweise zu. Der Grund hierfür dürfte in einer Bildung von Dimethylthiosulfinat aus asymmetrisch substituierten Thiosulfinaten liegen.

Bei -20°C und -70°C erfolgten im beobachteten Zeitraum nur geringe Veränderungen im Wirkstoffgehalt.

zu 2: Die Streßtests bei 37°C und 60°C wurden ebenfalls mit der in 1) verwendeten Extraktlösung durchgeführt. Zusätzlich wurde reiner Extrakt nach Abblasen des Lösungsmittels gestreßt, da Vorversuche gezeigt hatten, daß zwischen reinen und gelösten Thiosulfinaten Stabilitätsunterschiede bestehen können. Die Proben wurden in dicht verschlossenen, inerten HPLC-Probengefäßen im Wasserbad erhitzt. Nach 1, 2 und 5 Stunden wurden Proben gezogen und in der HPLC untersucht.

In Tabelle 10 ist das Ergebnis der Untersuchung zusammengefaßt. Angegeben ist der prozentuale Gehalt an Dimethylthiosulfinat sowie den Substanzen 1, 2, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat nach dem Erhitzen bezogen auf die vor Beginn der Untersuchung chromatographierte Referenzlösung.

Zeit (h)	Substanz(en)	37°C		60°C	
		in MeOH	rein	in MeOH	rein
1	<u>1,2</u> ,MP-/PMTs	91,6	87,9	95,1	41,7
	DM-Ts	93,5	71,5	104,2	34,9
2	<u>1,2</u> ,MP-/PMTs	97,7	64,5	99,1	31,2
	DM-Ts	101,7	41,7	116,3	13,2
5	<u>1,2</u> ,MP-/PMTs	94,2	47,6	86,4	11,7
	DM-Ts	105,6	33,8	115,8	11,8

1,2,MP-/PMTs = Mischung aus Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat und Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat;
DM-Ts = Dimethylthiosulfinat
die %-Werte sind aus dem Durchschnitt je zweier Einspritzungen berechnet;

Tab. 10: Ergebnisse der Streßtests mit Zwiebelextrakt

Man erkennt, daß in den in Methanol erhitzten Proben praktisch kein Abbau der Thiosulfinat erfolgt war. Bei Dimethylthiosulfinat ist in Lösung v.a. bei 60°C wiederum eine Zunahme des Gehaltes zu beobachten. In reinem Extrakt dagegen nimmt der Thiosulfinatgehalt bei 37°C und 60°C deutlich ab.

Um zu prüfen, ob nur Methanol Stabilisierungseffekte zeigt, wurden eine methanolische und eine ethanolische Lösung verglichen.

Tabelle 11 zeigt die Thiosulfinatgehalte beider Lösungen nach 1- und 2-stündigem Erhitzen auf 60°C.

Zeit (h)	Substanz(en)	60°C	
		in MeOH	in EtOH
1	<u>1,2</u> ,MP-/PMTs	91,3	51,6
	DM-Ts	107,3	16,3
2	<u>1,2</u> ,MP-/PMTs	77,8	37,5
	DM-Ts	115,2	13,5

1,2,MP-/PMTs = Mischung aus Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat und Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat;

DM-Ts = Dimethylthiosulfinat

die %-Werte sind aus dem Durchschnitt je zweier Einspritzungen berechnet;

Tab. 11: Vergleich von Streßtests mit Zwiebelextrakt in methanolischer und ethanolischer Lösung

Der Abbau der Thiosulfinate in methanolischer Lösung ist wiederum gering. In ethanolischer Lösung dagegen geht die Zersetzung ähnlich schnell vor sich wie im ungelösten Extrakt aus Tabelle 10.

Die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der Thiosulfinate des Zwiebelextraktes in ungelöster Form sowie in Methanol und Ethanol sind bisher nicht geklärt.

Im Widerspruch zur Stabilität des Extraktes in Methanol beim Streßtest scheint der Abbau der Thiosulfinate im Langzeit-Lagerungsversuch bei Raumtemperatur zu stehen. Der Abbau der Thiosulfinate in der bei Raumtemperatur gelagerten Probe könnte durch Lichteinwirkung bedingt sein, da die Raumtemperatur-Probe im Gegensatz zu allen anderen Proben dem Tageslicht ausgesetzt war.

Die Stabilität der Wirksubstanzen in methanolischer Lösung im Streßtest zeigt, daß der Extrakt unter geeigneten Bedingungen haltbar gemacht werden kann. Welche Lagerungsbedingungen und sonstigen Maßnahmen den besten Effekt zeigen, müssen weitere Untersuchungen klären.

Die mit Extrakten erhaltenen Ergebnisse sind nicht auf isolierte Reinsubstanzen übertragbar. Einerseits können im Extrakt enthaltene Substanzen aus anderen Stoffklassen stabilisierende oder die Zersetzung fördernde Wirkung haben. Andererseits haben eigene Untersuchungen gezeigt, daß unter geeigneten Bedingungen der Gesamtthiosulfinatgehalt in der Lösung einer Mischung verschiedener Thiosulfinat langsamer sinkt als in der Lösung einer Reinsubstanz. Die Erklärung dafür könnte in der intermediären Bildung von asymmetrisch substituierten Thiosulfinaten in Mischungen zu liegen. Allerdings waren die mit Reinsubstanzen und deren Mischungen erhaltenen Ergebnisse widersprüchlich, sodaß auch zur Klärung der Stabilität solcher Proben weitere Untersuchungen erforderlich sind.

VI. HPLC-Analyse schwefelhaltiger Verbindungen

Bisher wurde die chromatographische Trennung von schwefelhaltigen Verbindungen überwiegend mit Hilfe verschiedenster GC-Techniken durchgeführt [64,65,66]. Daneben wurde auch die Dünnschichtchromatographie eingesetzt [67,68].

Die Vorteile der Gaschromatographie liegen in der hohen Trennschärfe und der Tatsache, daß durch die Verwendung von z.B. Flammen- und Photoionisationsdetektoren auch Substanzen ohne Chromophore mit großer Empfindlichkeit nachgewiesen werden können [69]. Zudem erleichtert die Möglichkeit der GC-MS Direktkopplung die Identifizierung der getrennten Komponenten [70].

Der entscheidende Nachteil der GC ist die Temperaturbelastung der Probe, die bei der Analyse labiler schwefelhaltiger Verbindungen zu Zersetzungsreaktionen führt [71,8].

Eine schonende Analyse thermolabiler Verbindungen ist mit Hilfe der Hochdruckflüssigchromatographie möglich, die eine der GC vergleichbare Trennschärfe erreicht [72].

Allerdings ist die Detektion von Substanzen ohne chromophore Gruppen mittels UV-Detektoren problematisch. Zur Erfassung von z.B. sulfidischen Verbindungen oder Thiolen muß bei Wellenlängen unter 210 nm detektiert werden, was besondere Anforderungen an Reinheit und UV-Durchlässigkeit der verwendeten Elutionsmittel stellt.

Daher finden sich in der Literatur auch nur wenige Zitate über die HPLC-Analyse schwefelhaltiger Verbindungen:

- MÖCKEL [73] untersuchte systematisch die Grundlagen der Wechselwirkungen von elementarem Schwefel und schwefelhaltigen Molekülen mit RP-Material.
- STEWART und ROSS [74] setzten sich mit der Problematik der UV-Detektion von Ätherischölbestandteilen nach HPLC-Trennung auseinander.
- Von CHEN [71] wird die Analyse von 1,2,3,5,6-Pentathiepan, 1,2,4,5-Tetrathian und 1,2,4-Trithiolan in Extrakten aus *Lentinus edodes* Sing. beschrieben. Es wurden RP-Säulen mit einer Methanol/Wasser Gradientenelution verwendet.

- WU [72] analysierte das durch Wasserdampfdestillation gewonnene Ätherischöl von Allium cepa L. var. ascalonicum (Schalotte) an RP-Säulen mit einer Methanol/Wasser Gradientenelution und konnte 6 Peaks sulfidischen Verbindungen zuordnen.
- MIETHING [75] und JANSEN [76] gaben je eine quantitative Bestimmungsmethode mit externem Standard für Allicin in Allium sativum L. an. Dabei eluierte MIETHING mit n-Hexan von Kieselgelsäulen.
JANSEN verwendete RP-Säulen und isokratische Elution mit Methanol/Wasser Gemischen.
- VOIGT und WOLF [77] bestimmten die in Ölmazeraten aus Allicin gebildeten Ajoene und Vinylldithiine mit RP-HPLC unter Verwendung eines Acetonitril/Puffer Gradientensystems.

Die drei letztgenannten Arbeiten zeigen die Möglichkeiten auf, die die Anwendung der HPLC für die Analyse labiler Inhaltsstoffe der Allium-Arten bietet:

Sowohl das instabile Thiosulfinat Allicin als auch die Ajoene entziehen sich einer Bestimmung durch Gaschromatographie. Die wichtigsten Wirksubstanzen in Extrakten aus Allium sativum L. können somit auf chromatographischem Wege nur mit HPLC-Methoden nachgewiesen und selektiv quantitativ bestimmt werden. Wir verwendeten daher zur Analyse der wenig stabilen Inhaltsstoffe der Chloroformausschüttelung des Preßsaftes von Allium cepa L. ebenfalls die Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) an reversed phase Material mit Acetonitril/Wasser Gradientenelution. Um auch Substanzen ohne chromophore Gruppen zu erfassen, wurde bei 200 nm detektiert.

In einem Universalsystem für alle bearbeiteten schwefelhaltigen Verbindungen steigt die Acetonitrilkonzentration in 30 min linear von 20% auf 80% (System 1). In diesem System liefert der Extrakt aus Allium cepa L. das auf Seite 15 abgebildete Chromatogramm. Abbildung 42 zeigt den Zusammenhang zwischen den Strukturen der chromatographierten Substanzen und den in diesem System erhaltenen Retentionszeiten. Aufgeführt sind die charakteristischen Inhaltsstoffe von Allium cepa L. und Allium sativum L. sowie weitere Verbindungen aus den Stoffgruppen der Thiosulfinate, Thiosulfonate und Disulfide.

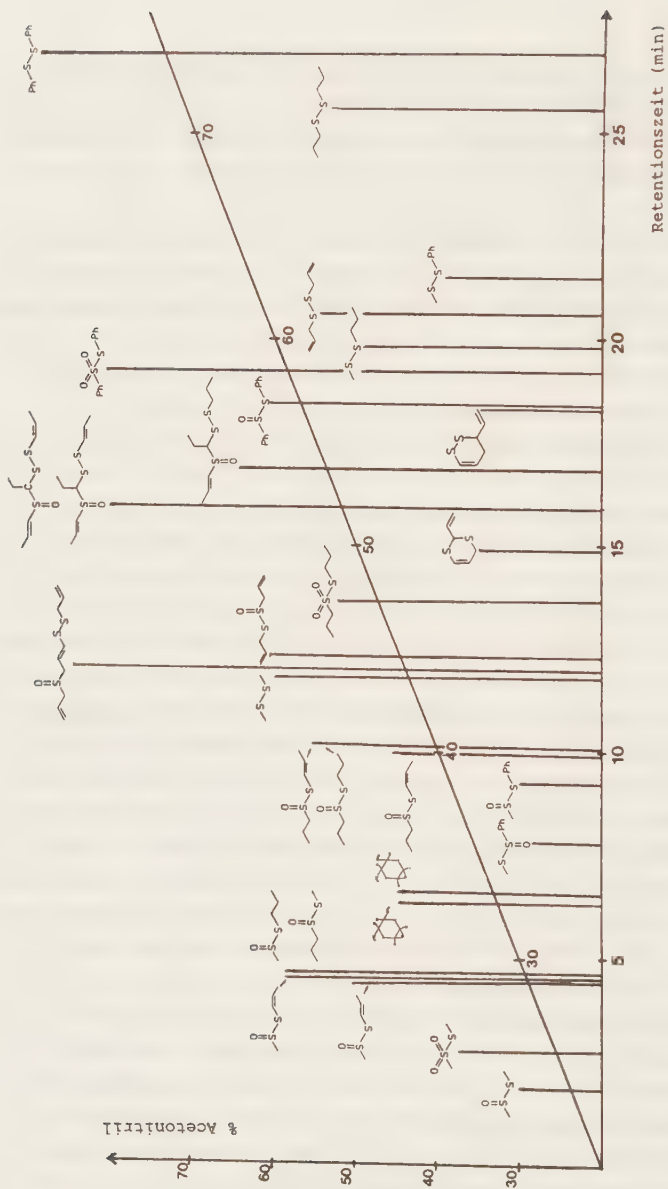


Abb. 42: Retentionszeiten schwefelhaltiger Verbindungen im HPLC-System 1

- 1) Thiosulfonate verhalten sich auf der RP-Säule lipophiler als identisch substituierte Thiosulfinate, und Disulfide werden deutlich nach den entsprechenden Thiosulfonaten eluiert (vergleiche z.B. Dimethylthiosulfinat, Dimethylthiosulfonat und Dimethyldisulfid).
Wie zu erwarten, steigt die Retentionszeit innerhalb obiger Gruppen mit zunehmender Lipophilie der Substituenten an: z.B. von Dimethylthiosulfinat über Methylpropyl/Propylmethylthiosulfinat bis Dipropylthiosulfinat.
- 2) Ein Vergleich der Retentionszeiten von Dipropylthiosulfinat und Propyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat bzw. von Methylpropyl-Propylmethylthiosulfinat und Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat zeigt, daß sich die Einführung einer Doppelbindung in α -Stellung in ein Thiosulfinat nur wenig auf die Retentionszeit auswirkt. Das 2-fach in β, γ -Stellung ungesättigte Allicin (RT=12,3 min) dagegen verhält sich überraschenderweise "lipophiler" als Dipropylthiosulfinat (Rt=10,1 min).
- 3) Stellungsisomerie des Thiosulfinatsauerstoffs wirkt sich in Abhängigkeit von den Substituenten an der Thiosulfinatfunktion verschieden stark aus:
Methylpropylthiosulfinat und Propylmethylthiosulfinat zeigen nur einen Retentionszeitunterschied von 0,2 min. Phenylmethylthiosulfinat wird dagegen 1,3 min nach Methylphenylthiosulfinat eluiert. Das bedeutet, daß bei Substituenten stark unterschiedlicher Lipophilie (hier: Methyl- und Phenylgruppe) die Konfiguration der Thiosulfinatfunktion stärkere Auswirkung auf das chromatographische Verhalten der Substanz auf RP-Material hat, als bei Substituenten, die weniger stark im Lipophiliegrad differieren (hier: Methyl- und Propylgruppe).

- 4) Die verzweigt-kettigen, um eine Doppelbindung ärmeren Cepaene erscheinen bei deutlich längerer Retentionszeit als die 3-fach ungesättigten, linear gebauten Ajoene. Einfach ungesättigte Cepaene verhalten sich mit einer Retentionszeit von 16,8 min "lipophiler" als zweifach ungesättigte Substanzen dieser Gruppe ($R_t=15,8$ min).
- 5) Die nur in ihrer Konfiguration verschiedenen, epoxidierten Dithiane aus Allium cepa L. werden getrennt und zeigen geringere "Lipophilie" als die Vinyl-dithiane aus Allium sativum L.
- 6) Cis/trans-Doppelbindungs-isomere sind bei den Methyl-1-propenyl-thiosulfinaten und den Propyl-1-propenylthiosulfinaten trennbar. Bei lipophileren Molekülen wie Ajoenen und Cepaenen gelingt die Auftrennung der cis/trans-Isomere nicht mehr. Ebensovienig erfolgt in der Gruppe der Cepaene die Trennung von Diastereomerenpaaren, was zur Überlagerung von 4 Substanzen in einem Peak der Retentionszeit 15,9 min führt. Hier zeigt sich die Dünnschichtchromatographie an Kieselgel der HPLC an RP-Material überlegen: Bei der DC sind die Diastereomerenpaare aus der Gruppe der Cepaene trennbar.

Dieses Beispiel zeigt, daß die HPLC-Trennung eines komplexen Naturstoffgemisches, wie es z.B. im Zwiebelextrakt vorliegt, immer noch Probleme bereiten kann.

Trotzdem kann die Hochdruckflüssigchromatographie aufgrund ihrer Trennschärfe und der Möglichkeit zur Analyse thermolabiler Verbindungen bei der Untersuchung lipophiler, ohne Wärmeanwendung hergestellter Extrakte aus Allium-Arten als die Methode der Wahl angesehen werden.

PHARMAKOLOGISCHER ABSCHNITT

I. Asthma bronchiale

I.1. Begriffsbestimmung:

Laut Pschyrembel [78] handelt es sich beim Bronchialasthma um "kurzdauernde Anfälle von hochgradiger Atemnot mit besonders erschwerter Ausatmung (exspiratorische Dyspnoe)".

Die Atemnot resultiert aus einer Obstruktion der kleinen Luftwege. Für diese Verengung gelten drei Mechanismen als hauptverantwortlich:

- die entzündlich-ödematöse Schwellung der Schleimhaut des Bronchialtraktes,
- die Einengung des Bronchiallumens durch Schleim (Hyperkrinie und Dyskrinie),
- die Kontraktion der glatten Muskulatur (Bronchospasmus).

Diese Trias der bronchialen Obstruktion ist eine Folge von Kontakt mit Allergenen und Schadstoffen. Daneben spielen häufig körperliche Anstrengung und psychische Faktoren eine Rolle. Wichtige Voraussetzung für das Auftreten von Asthmasymptomen ist die sog. bronchiale Übererregbarkeit, die durch entzündliche Reaktionen in den Luftwegen hervorgerufen wird. Im Folgenden soll v.a. auf das allergische Asthma bronchiale eingegangen werden, dessen Pathogenese mit derjenigen der Entzündung eng verknüpft ist.

I.2. Pathophysiologie des allergischen Asthma bronchiale

Abbildung 43 gibt einen Überblick über die Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale und über die wichtigsten beteiligten Überträgerstoffe:

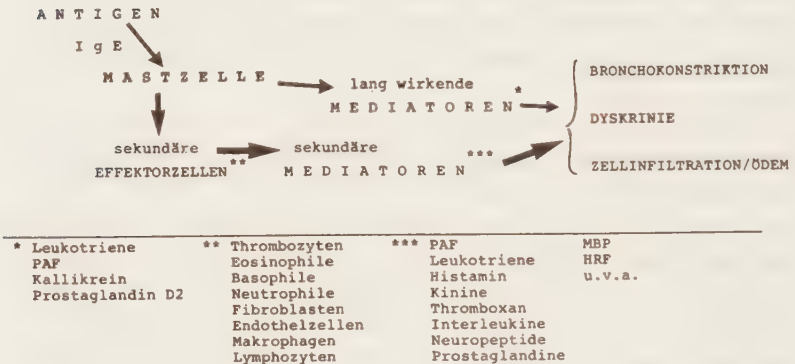


Abb. 43: Effekte der IgE-vermittelten Mastzellstimulierung

I.2.1. Die wichtigsten beteiligten Zellarten:

Beim allergischen Asthma bronchiale ist der auslösende Faktor für einen Asthmaanfall die Aktivierung von Mastzellen in der Lunge. Die Aktivierung erfolgt durch die Antigenvernetzung zellständiger IgE-Antikörper. Aktivierte Mastzellen degranulieren und setzen in den Granula gespeicherte Mediatorsubstanzen frei. Als klassischer "vorgeformter" Mediator gilt Histamin [79]. Darüberhinaus werden in Mastzellen chemotaktische Proteine und Peptide [80,81] (z.B. neutrophil chemotactic factor = NCF und eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis = ECF-A), lysosomale Enzyme [82], Proteoglykane [83] (z.B. Heparin), Enzyme mit Proteaseaktivität [84], Myeloperoxidase und Superoxiddismutase gespeichert [85].

Weiterhin führt die IgE vermittelte Mastzellstimulierung zur de novo Synthese von asthma- und entzündungsrelevanten Mediatorsubstanzen. Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure und das Etherlipid 1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin [86] (platelet activating factor=PAF) spielen dabei die größte Rolle. Die Hauptprodukte des Arachidonsäurestoffwechsels in Mastzellen sind PGD_2 , TXA_2 , 5-HETE, LTB_4 und LTC_4 [87]. Ein Teil der von Mastzellen sezernierten Überträgerstoffe wirken auf Leukozyten chemokinetisch und chemotaktisch. Auf die Mastzellaktivierung folgt die Permeation von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe [88]. Diese werden wiederum durch Mediatorsubstanzen oder IgE-abhängig aktiviert und setzen ihrerseits proinflammatorische und andere, das Asthma fördernde, Substanzen frei.

Bei neutrophilen Granulozyten stehen LTB_4 , PAF, aktivierte Sauerstoffspezies und proinflammatorische Enzyme (Myeloperoxidase, Proteasen, Lysozyme), die aus azurophilen und spezifischen Granula stammen, im Vordergrund [89]. Die Aktivität der in die Lunge infiltrierten neutrophilen Granulozyten wird als Ursache für die "verzögerte Reaktion" beim Asthma bronchiale diskutiert.

Eosinophile Granulozyten sezernieren vorwiegend LTC_4 [90] und das zytotoxische "Major Basic Protein" (MBP) [91].

In den letzten Jahren wurde den Alveolarmakrophagen (AM) eine steigende Bedeutung bei der Auslösung und Aufrechterhaltung asthmatischer Symptome zugeschrieben. Sie sind durch eine Reihe spezifischer und unspezifischer Mechanismen aktivierbar. Neben ihren länger bekannten Funktionen bei der Aufbereitung und Präsentation von Antigenen sowie der Regulierung der Immunantwort spielen Alveolarmakrophagen auch eine wichtige Rolle als sezernierende Zellen [92]. Sie setzen eine Reihe von z.T. proinflammatorischen Enzymen [93] (z.B. β -Glucuronidase) und Proteinen (z.B. einen die Schleimbildung fördernden Faktor [94]) sowie vermutlich Komplementfaktoren frei. An Cyclooxygenaseprodukten sind PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und TXA_2 [95], an Lipooxygenaseprodukten 5-HETE, LTB_4 und SRS-A (slow reacting substance of anaphylaxis) [96] zu nennen. Weiterhin bilden und sezernieren

Alveolarmakrophagen aktivierte Sauerstoffspezies (z.B. Superoxidradikale) und PAF.

Zusätzlich spielen weitere Zellpopulationen wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und Thrombozyten in der Pathogenese des Asthma bronchiale eine Rolle.

I.2.2. Mediatorwirkungen:

Die biologischen Aktivitäten der Mediatoren, die von asthmarelevanten Zellen sezerniert werden, sind in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Allerdings sind die Ergebnisse, bedingt durch Unterschiede zwischen den Spezies, durch Heterogenität der verwendeten Zellpopulationen und unterschiedliche Zell-Zell-Interaktionen in verschiedenen Präparationen, nicht immer vergleichbar. Die wichtigsten der gesicherten Mediatorwirkungen sind nachstehend kurz zusammengefaßt:

- LTB_4 hat starke chemotaktische und chemokinetische Aktivität [97,98]. Daneben bewirkt die Substanz Erhöhung der Gefäßpermeabilität und eine - allerdings schwache - Kontraktion glatter Muskulatur.
- LTC_4 , LTD_4 und LTE_4 ("SRS-A") zeigen als hervorstechende pharmakologische Eigenschaft eine starke Kontraktionswirkung auf glattmuskuläre Organe der verschiedensten Tierarten [99,100]. SRS-A wirkt etwa 1000x stärker als Histamin. Die Muskelkontraktion ist langsam und lang anhaltend. Von Bedeutung ist auch die Kapillarpermeabilitätserhöhung durch SRS-A, die bei asthmatischen Patienten zur submukosalen Ödembildung beiträgt [101,102].
Eine Beteiligung von LTC_4 und LTD_4 an erhöhter Schleimbildung [103] und Erniedrigung des trachealen Schleimtransports [104] beim Asthma bronchiale ist ebenfalls erwiesen.
- Mono-HETE's (z.B. 5-HETE) sind Chemoattraktantien für neutrophile und eosinophile Granulozyten.

- $\text{PGF}_{2\alpha}$ [105,106], PGD_2 [107] und TXA_2 [108,109] verfügen über effektive bronchokonstriktorische Aktivität. Im Vergleich zu den SRS-A spielen die Prostaglandine bei der Bronchokonstriktion im Asthma bronchiale jedoch eine eher untergeordnete Rolle.
- PGE_1 wirkt - auch beim asthmatischen Patienten - bronchodilatatorisch [110].
- PGD_2 erhöht die Chemokinese [111].
- Histamin bewirkt eine schwache Kontraktion glatter Muskulatur, geringe Erhöhung der Gefäßpermeabilität und modifiziert Lymphozytenfunktionen [112].
- Das Major Basic Protein (MBP) der eosinophilen Granulozyten wirkt in vitro zytotoxisch auf humane Bronchialepithelzellen [113]. In vivo wird die Zerstörung des Zilienapparates durch MBP, die beim asthmatischen Patienten zur verminderten Beseitigung des Bronchialschleimes führt, diskutiert.
- PAF: Inhalation und i.v. Injektion von PAF führt bei verschiedenen Tierspezies [114] und beim Menschen [115] zu asthmatischen Reaktionen.
PAF akkumuliert Thrombozyten und andere Blutzellen wie Lymphozyten und Histiozyten [116]. Blutplättchen werden aktiviert, aggregiert und setzen ihre granulären Inhaltsstoffe frei [117]. Mastzellen degranulieren nach Kontakt mit PAF [118]. PAF wirkt chemotaktisch auf polymorphkernige Leukozyten [119]. Kontakt dieser Zellen mit PAF führt zu deren Aggregation [120] und Anlagerung [121] (z.B. an Endothelzellen), zur Degranulation [122,123,124] mit Mediatorfreisetzung sowie zur Sezernierung reaktiver Sauerstoffradikale [120,125]. PAF führt zu einer Aggregation von Monozyten [126]. Darüberhinaus erhöht PAF durch direkten Einfluß auf Endothelzellen die Gefäßpermeabilität [127] und erleichtert so die Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe.

I.2.3. Biosynthese wichtiger Mediatorstoffe nach Zellaktivierung

I.2.3.1. Arachidonsäurekaskade:

In der Pathophysiologie des Asthma bronchiale spielen Stoffwechselprodukte der Arachidonsäure als Mediatoren eine entscheidende Rolle. [128]

Nach Aktivierung werden in Zellen des Lungengewebes und in Zellen, die im Laufe einer Entzündung in das Lungengewebe infiltrieren, die Phospholipasen A₂ und C sowie die Diacylglyceridlipasen stimuliert. Die Phospholipasen setzen aus Membranphospholipiden, Diacylglyceridlipasen aus Diacylglycerolen Arachidonsäure frei. Die freie Arachidonsäure steht zur oxidativen Verstoffwechselung durch die Cyclooxygenase und verschiedene Lipoxygenasen zur Verfügung.

Abbildung 44 gibt eine Übersicht über die Arachidonsäurekaskade. Die Produktpaletten unterschiedlicher Zellarten sind in Abhängigkeit von deren Enzymmuster verschieden.

Die größte Bedeutung als Mediatoren beim Asthma bronchiale haben dabei die Leukotriene (LT) und Hydroxieicosatetraensäuren (HETE's) als 5-Lipoxygenaseprodukte sowie das Thromboxan A₂ (TXA₂) als Cyclooxygenaseprodukt. Die Prostaglandine (PG) spielen eine eher untergeordnete Rolle.

I.2.3.2. Biosynthese und Stoffwechsel von PAF:

Wie die Eicosanoide wird auch das Etherlipid 1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (PAF) nach Zellstimulierung synthetisiert. Dabei wird Acetyl-CoA mit der freien Hydroxi-Gruppe in 2-Position von 1-O-Alkyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin verestert [129]. Inaktivierung erfolgt durch Abspaltung der Acetylgruppe durch eine spezifische Acetylhydrolase zu "Lyso-PAF". Durch die Übertragung von bevorzugt Arachidonsäureresten auf Lyso-PAF entstehen 1-O-Alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine [130]. Diese stellen eine gemeinsame Vorstufe für die Synthese von Eicosanoiden und PAF dar, was die Vernetzung beider Biosynthesewege aufzeigt.

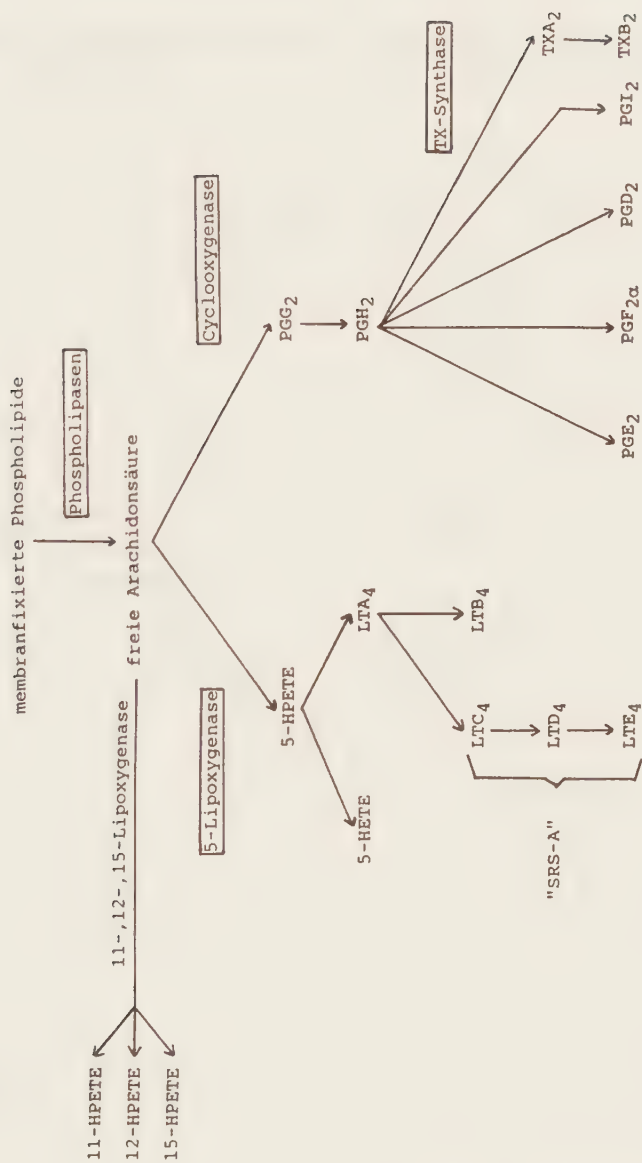


Abb. 44: Übersicht über den Arachidonsäurestoffwechsel

I.3. Eingriffsmöglichkeiten in pathologische Abläufe beim Asthma bronchiale

I.3.1. Kausaltherapie:

Kausaltherapie ist nur bei Kenntnis der auslösenden Ursachen z.B. durch Schadstoff- bzw. Antigenkarenz oder spezifische Hyposensibilisierung möglich.

I.3.2. Bronchospasmolytika:

Theophyllinderivate, indirekt (z.B. Ephedrin) und direkt (z.B. Salbutamol) wirkende β_2 -Sympathomimetika sowie manche Anticholinergica (z.B. Ipratropiumbromid) bewirken Spasmolyse an der glatten Bronchialmuskulatur. Über eine zweite, spezifische Wirkungskomponente an Mastzellen und Leukozyten wird durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels die Ausschüttung der Mediatorsubstanzen gehemmt. Dabei stimulieren β -Sympathomimetika die Adenylatcyclase wogegen Theophyllinderivate die Phosphodiesterase hemmen.

I.3.3. Expektorantien:

Expektorantien (z.B. Bromhexin) verflüssigen die bronchialen Schleimauflagerungen und erleichtern so die Beseitigung von Hyper- und Dyskrinie durch Abhusten.

I.3.4. Hemmung der Mastzelldegranulation:

Prophylaktische, inhalative Anwendung des Dinatriumsalzes der Cromoglicinsäure stabilisiert die Mastzellmembran. Die IgE-vermittelte Mediatorfreisetzung aus Mastzellen wird so inhibiert.

I.3.5. Einsatz von Rezeptorantagonisten asthmainduzierender Mediatoren:

Einzig H_1 -Antihistaminika haben bisher als Rezeptorantagonisten Eingang in die Therapie des Asthma bronchiale gefunden. Ihre Wirksamkeit und damit Bedeutung ist allerdings aufgrund der untergeordneten Rolle des Histamins im Vergleich zu den Leukotrienen in der Pathogenese des Bronchialasthmas gering.

I.3.6. Eingriffe in den Arachidonsäurestoffwechsel

Als effektive Eingriffsmöglichkeit kommt die Inhibierung von Schlüsselenzymen der Biosynthese in Frage:

- Hemmung von Acyldihydrolasen, z.B. der Phospholipase A_2 mittels Lipocortinsynthesesteigerung durch Glucocorticoide, vermindert die Bereitstellung des Substrats für Cyclooxygenase und Lipoxygenasen und erzielt somit eine weitgehende Hemmung allergischer und entzündlicher Prozesse. Aufgrund der wichtigen physiologischen Funktionen der Acyldihydrolasen sind sowohl direkt als auch indirekt wirkende Phospholipase A_2 Inhibitoren wegen schwerwiegender Nebenwirkungen nicht universell einsetzbar.
- Spezifische Cyclooxygenasehemmstoffe, z.B. nicht steroidale Antirheumatika wie Indomethacin, müssen wegen der Hemmung der Biosynthese bronchodilatatorisch wirkender Prostaglandine einerseits sowie einer evtl. erhöhten Substratbereitstellung für die Bildung von 5-Lipoxygenaseprodukten andererseits bei Asthmapatienten zurückhaltend eingesetzt werden [131].

- Spezifische Hemmstoffe der 5-Lipoxygenase sollten einen gezielten Eingriff in die Pathophysiologie des Asthma bronchiale ermöglichen, da alle 5-Lipoxygenaseprodukte (un)mittelbare Wirkfaktoren im asthmatischen Geschehen darstellen.
- Duale Hemmstoffe von Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase führen nicht zum "Arachidonsäure-Shift". Ihre anti-inflammatorische Aktivität sollte zusätzlich positive Wirkung beim Asthma bronchiale zeigen.

Die Ergebnisse von in vitro (und mit Einschränkungen auch in vivo) Untersuchungen zeigen, daß die 5-Lipoxygenasehemmung einen aussichtsreichen Ansatz für die Therapie des asthmatischen Formenkreises darstellt:

An isolierten Zellsystemen, deren Haupt-5-Lipoxygenasemetaboliten die SRS-A sind, kann durch Lipoxygenaseinhibitoren dosisabhängig eine Reduktion der SRS-A-Biosynthese erreicht werden [132,133]. Bei Mastzellen und Basophilen [134] - nicht allerdings im Lungengewebe von Meerschweinchen [135] und Mensch [136] - bewirkt Lipoxygenasehemmung parallel auch eine effektive Degranulationshemmung und damit Verminderung der Histaminfreisetzung. Die Ursache dieses differenten Effektes von Lipoxygenaseinhibitoren auf verschiedene Zellsysteme ist nicht geklärt. Die komplexe Zusammensetzung des Lungengewebes mit vielfältigen Möglichkeiten der gegenseitigen Beeinflussung durch verschiedene Zellpopulationen könnte einen Grund darstellen. Unübersichtlicher sind die Verhältnisse an isolierten Organpräparaten und in vivo. Abhängig vom verwendeten Modell, Art und Intensität der Stimulation sowie Spezifität und Dosis des verwendeten Cyclooxygenase- und/oder Lipoxygenasehemmstoffes werden die Kontraktion glattemuskulärer Organe und auch der allergische Bronchospasmus bei Meerschweinchen und Affe unterschiedlich beeinflusst.

Ein Vergleich der gemessenen Lipoxxygenasehemmung durch ein Pharmakon in vitro und dem beobachteten antiasthmatischen Effekt am Ganztier zeigt, daß zwischen beiden keine strenge Korrelation besteht. Zudem ist trotz grundsätzlich vergleichbarer biochemischer Abläufe bei Entstehung und Aufrechterhaltung asthmatischer Zustände bei Meerschweinchen und Mensch [137,138] in Anbetracht gegebener Unterschiede die Übertragbarkeit der im Tierexperiment erzielten Ergebnisse auf den Menschen nicht in jedem Fall gegeben.

Trotz dieser Problematik wird allgemein akzeptiert, daß inhibierende Eingriffe in den Arachidonsäuremetabolismus, v.a. Hemmung der 5-Lipoxxygenase, beim Versuchstier und am Menschen zur Hemmung asthmatischer und allergischer Reaktionen führen.

I.3.7. Verminderung der Leukozytenchemotaxis:

Eine Verminderung der Infiltration von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten nach IgE-abhängiger Mastzellstimulierung sollte positive Einflüsse v.a. auf die verzögerte Phase der asthmatischen Reaktion zeigen.

II. Pharmakologische Untersuchungen

II.1. Testsysteme

II.1.1. Für das Screening in Frage kommende und verwendete in vitro Testsysteme:

Für ein Screening von Drogenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen auf deren antiasthmatische Wirkung kommen folgende in vitro Modelle in Frage:

- Modelle zur Prüfung auf Verminderung der Histaminfreisetzung aus Mastzellen oder basophilen Leukozyten
- Testsysteme, die Aufschluß über eine Hemmung der Leukozytenmigration geben
- Modelle zur Prüfung auf Inhibierung der Freisetzung des Major Basic Proteins aus eosinophilen Leukozyten
- Histamin-, PAF- und Leukotrienrezeptorantagonistenmodelle
- Systeme, die die Verminderung der Stimulierbarkeit von Entzündungszellen durch Mediatorsubstanzen anzeigen
- Modelle zur Prüfung auf Hemmung der Phospholipase A₂, der Cyclooxygenase, der Thromboxan-Synthase und v.a. der 5-Lipoxygenase

Nachstehend werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten in vitro Testsysteme ausführlicher beschrieben.

II.1.1.1. Prüfung auf Beeinflussung der Histaminfreisetzung aus humanen peripheren Leukozyten:

Aus dem Blut atopischer Spender werden periphere Leukozyten isoliert und mit Testsubstanz oder in der Kontrolle mit entsprechenden Konzentrationen Lösungsmittel 10 min inkubiert. Danach wird durch Zugabe von α -IgE-Antikörpern Histaminfreisetzung ausgelöst. Das Histamin im Überstand wird spektrofluorometrisch bestimmt [139].

Die Histaminfreisetzungsrates wird nach Abzug der spontanen Freisetzung auf die Maximalfreisetzung nach Zellzerstörung mit Perchlorsäure bezogen.

II.1.1.2. Prüfung auf Beeinflussung der Thromboxan B₂-Biosynthese im plättchenreichen Plasma (PRP):

PRP atopischer Spender wird 3 min mit der Testsubstanz oder Lösungsmittel inkubiert. Stimulierung erfolgt mit Thrombin. Nach 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von eiskaltem Methanol gestoppt und Thromboxan B₂ im Überstand nach SIESS [140] durch RIA gemessen.

II.1.1.3. Prüfung auf Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität:

Mikrosomen aus Schafsamenblasen werden nach NUGTEREN [141] isoliert und bei 23°C unter Zusatz von Adrenalinbitartrat, GSH und Natrium-EDTA 5 min vorinkubiert [142]. Die Testsubstanz wird dem Ansatz in ethanolischer Lösung zugesetzt, die Kontrolle enthält eine entsprechende Menge Ethanol. Zugabe von 1-¹⁴C Arachidonsäure startet die Reaktion, die nach 20 min mit Ameisensäure gestoppt wird. Nach Extraktion der nicht umgesetzten Arachidonsäure und ihrer markierten Metabolite erfolgt Auftrennung mit RP-HPLC und quantitative Bestimmung mittels Radioaktivitätsdetektor [143].

II.1.1.4. Prüfung auf Beeinflussung der 5-Lipoxygenaseaktivität:

Die Beeinflussung der 5-Lipoxygenaseaktivität wird in isolierten Schweineleukozyten untersucht. Die Zellen werden mit Ionophor A 23187, 1-¹⁴C markierter Arachidonsäure und Testsubstanz bzw. einer entsprechenden Menge Lösungsmittel unter Zusatz von ETYA zur Hemmung der 12-Lipoxygenase 5 min bei 37°C inkubiert [142]. Nach Extraktion erfolgt die Auftrennung und Quantifizierung der Arachidonsäure und ihrer Metabolite wie beim Cyclooxygenasehemmtest [144].

II.1.1.5. Prüfung auf Beeinflussung der PAF-induzierten Chemolumineszenz humaner neutrophiler Granulozyten (PMNL):

Die PAF-induzierte Superoxidproduktion humaner PMNL ist ein selektiver, nichttoxischer Prozeß [145], der mit den übrigen Effekten der Zellstimulierung parallel geht [119] und daher als Maß für die Aktivierung der Zellen durch PAF angesehen werden kann.

Freisetzung von Superoxidanionen kann z.B. durch spektrophotometrische Messung der durch SOD (Superoxiddismutase) hemmbaren Reduktion von Ferricytochrom C bestimmt werden [146].

Wir benutzten zur Bestimmung der Freisetzungsrates von Superoxidradikalen die Messung der Chemolumineszenz, die bei der Reaktion der Radikale mit geeigneten Substanzen wie z.B. Luminol auftritt. Der Meßvorgang ist dabei eine Photonenzählung im Photomultiplier [147]. Die Chemolumineszenzmessung im 6-Kanal Biolumat ermöglicht die Parallelmessung von 6 Proben unter identischen Bedingungen.

Humane PMNL werden mit Testsubstanz oder Lösungsmittel, Cytochalasin B und Luminol bei 37°C im Photomultiplier vorinkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von PAF gestartet und 10 min gemessen.

II.1.1.6. Prüfung auf Radikalfängereigenschaften:

Eine Verminderung der Chemolumineszenz im System II.1.1.5. kann auf Radikalfängereigenschaften der Testsubstanz beruhen. Daher wird das Radikalfangpotential einer Substanz in einem zellfreien, Superoxid-erzeugenden System aus Purin und Xanthinoxidase nach CHESON [148] im 6-Kanal Biolumat geprüft. Verminderung der Chemolumineszenz in diesem System zeigt entweder Radikalfängereigenschaften einer Substanz oder deren Hemmwirkung auf die Xanthinoxidase an.

II.1.2. Asthmamodelle in vivo:

Als Tiermodelle für asthmatische Zustände stehen die anaphylaktischen Reaktionen von Ratten, Meerschweinchen, Schafen, Hunden und Rhesusaffen zur Verfügung. Am häufigsten werden Meerschweinchenmodelle verwendet, obwohl die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen nicht 100%-ig gesichert ist. Zur Messung des intrapulmonalen Drucks und damit des Grades der bronchialen Obstruktion stehen am Ganztier verschiedene Methoden zur Verfügung:

- Die overflow-Präparation nach Konzett-Rößler [149]
- Körperplethysmographische Anordnungen unter Verwendung eines Pleurakatheters [150]
- Ganzkörperplethysmographische Methoden mit Trachealkanüle [151]

Diese Methoden sind invasiv. Sie erfordern Narkose und/oder künstliche Beatmung [151].

Als Parameter werden i.d.R. der Atemwegswiderstand, das Thoraxgasvolumen oder der spezifische Atemwegswiderstand verwendet.

II.1.2.1. Prüfung auf Beeinflussung der Allergen-induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen:

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten in vivo Ergebnisse wurden mit einem Zweikammer-Ganzkörperplethysmographen (Abb. 45) ermittelt. Gemessen wurde der Parameter "compressed air".

Die verwendete Meßmethode am "intakten, spontan atmenden Ganztier" ist nicht invasiv. Sie erfordert weder Katheterisierung bzw. Kanülierung noch Narkose oder künstliche Beatmung. Damit sind Überkreuzprotokolle zwischen Kontroll- und Verumgruppe möglich, durch die die unterschiedliche Empfindlichkeit der Versuchstiere gegen die Provokation als Störfaktor eliminiert wird.

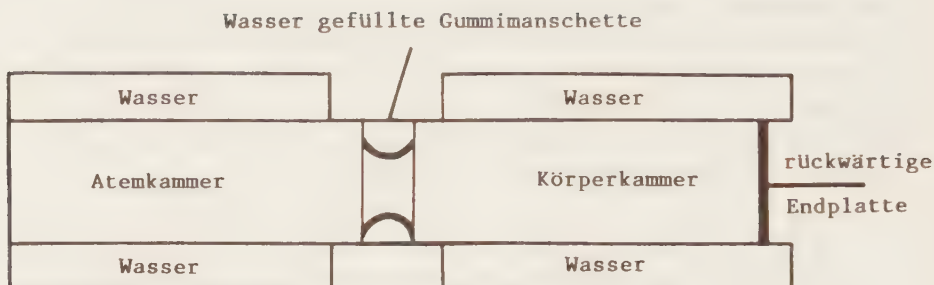


Abb. 45: Schemazeichnung eines Zweikammer-Ganzkörperplethysmographen

Der gemessene Parameter "compressed air" ist das Volumen, um das das intrathorakale Gasvolumen komprimiert werden muß, um den beim Asthma bronchiale erhöhten Atemwegswiderstand zu überwinden. Der Parameter wird durch Vergleich der beim Atemvorgang gemessenen Volumenänderungen in Kopf- und Körperkammer ermittelt. Dabei nimmt im Asthmaanfall während der behinderten Ausatmung das Volumen in der Atemkammer nicht im selben Maße zu, wie das Volumen in der Körperkammer abnimmt. Die Bestimmung von "compressed air" hat gegenüber der Messung von (spezifischem) Atemwegswiderstand und Thoraxvolumen den Vorteil höherer Empfindlichkeit. Bei der Testauswertung werden die Mittelwerte $\bar{x}$ der gemessenen "compressed air"-Werte von Kontroll- und Verumgruppe verglichen. Statistische Signifikanz wird mit dem Students t-Test für ungepaarte Daten berechnet. Zusätzlich wird der Vergleich der höchsten gemessenen compressed air-Werte jedes Tieres bei Placebo- und Verumbehandlung zur Auswertung herangezogen.

Zur Bestimmung des Einflusses von Testsubstanzen auf die Allergen-induzierte bronchiale Obstruktion wurden Meerschweinchen durch intraperitoneale und subcutane Injektion gegen Ovalbumin sensibilisiert. 2-3 Wochen später wurde durch Inhalation des Allergens ein Asthmaanfall provoziert. 45 min vor der Provokation erhielten die Versuchstiere peroral Testsubstanz im Träger (Verum) oder nur Träger (Kontrolle). Nach 3-4 Tagen wird der Versuch unter Austausch von Verum- und Kontrollgruppe als Überkreuzprotokoll wiederholt. Über weitere Einzelheiten der experimentellen Durchführung s. Exp. Teil S. 176 und DORSCH u. Mitarb. [152].

II.1.2.2. Prüfung auf Beeinflussung der PAF-induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen:

Der verwendete Testaufbau entspricht II.1.2.1. Abweichend von der ersten Versuchsanordnung werden die Versuchstiere nicht sensibilisiert. Das Asthma wird durch Inhalation des Asthmadeiators 1-O-Alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholin (platelet activating factor/PAF) provoziert.

II.2. Ergebnisse und Diskussion

II.2.1. Ergebnisse und Diskussion der in vivo Versuche:

Da für die Auffindung des Wirkprinzips von Anfang an die Beeinflussung der bronchialen Obstruktion als Testsystem eingesetzt wird, werden diese Ergebnisse an den Anfang gestellt.

Die Provokation erfolgte teils mit PAF und teils mit Ovalbumin.

In Abbildung 46 ist die graphische Auswertung einer Versuchsreihe mit einer wirksamen und einer Versuchsreihe mit einer unwirksamen Zwiebelsubstanz gegenübergestellt. Die Mischung der Substanzen 1 und 2 hatte im Gegensatz zur Substanz 3 in einer Dosis von 20 mg/kg eine starke, signifikante Schutzwirkung gegen das PAF-induzierte Meerschweinchenasthma gezeigt.

In Tabelle 12 sind die wichtigsten der mit Zwiebelextrakten, Fraktionen, isolierten und synthetisierten Reinsubstanzen im Tierversuch erhaltenen Ergebnisse zusammengefaßt.

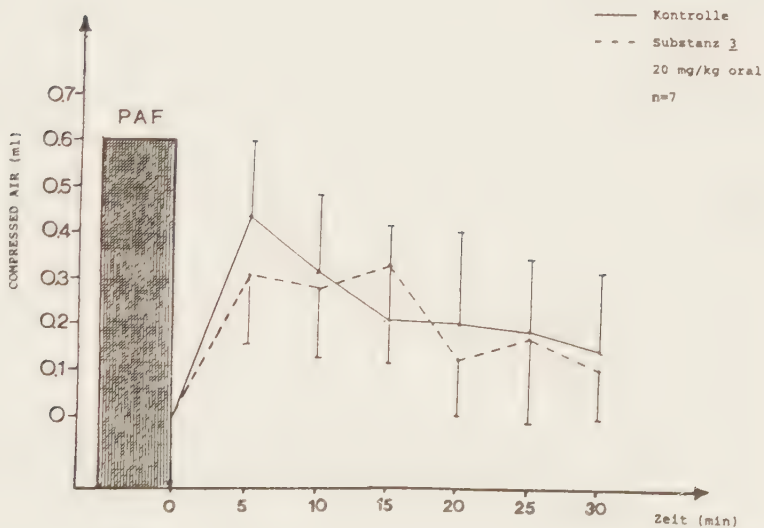
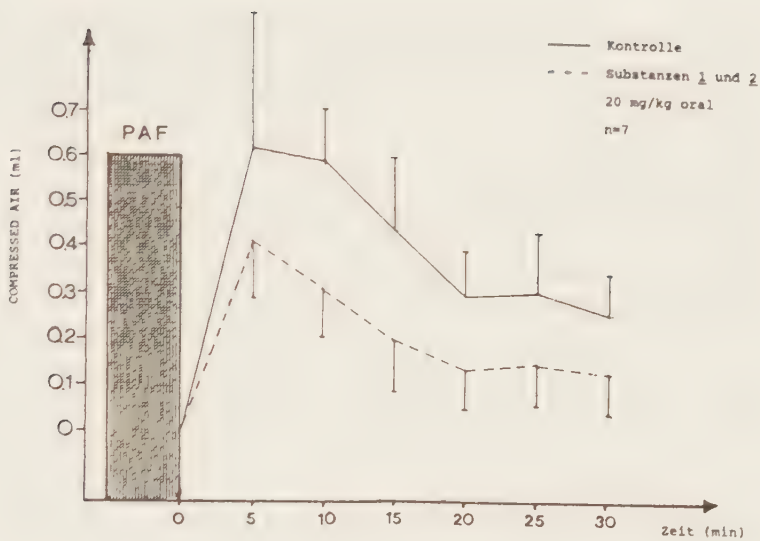


Abb. 46: Graphische Darstellung der Ergebnisse zweier Versuchsreihen beim PAF-induzierten Meerschweinchenasthma

Proben- bezeichnung	Dosis (mg/kg)	Anzahl Tiere	Provokation durch	Signifik. wirkung
Ether-Perkolat aus lyoph. Zw.	50	8	PAF	+
CHCl ₃ -Aussch. aus Zwiebelsaft	50	8	PAF	+
Fraktion <u>I</u>	50	10	PAF	-
Fraktion <u>II</u>	50	10	PAF	+
Fraktion <u>III</u>	50	10	PAF	-
Fraktion <u>IV</u>	50	10	PAF	-
Fraktion <u>II/0</u>	20	7	PAF	-
Fraktion <u>II/1</u>	20	7	PAF	-
Fraktion <u>II/2</u>	20	7	OA/PAF	+/+
Fraktion <u>II/3</u>	20	7	OA/PAF	+/+
Fraktion <u>II/4</u>	20	7	PAF	-
Substanzen <u>1+2</u>	20	8	OA/PAF	+/+
Substanz <u>3</u>	20	8	PAF	-
Dimethyl-TS*	50	10	OA/PAF	+/+
Dipropyl-TS*	50	9	PAF	-
Methylpropyl-TS (Isomerengem.)*	50	8	PAF	-
Diallyl-TS	40	8	PAF	-
Methylphenyl-TS	50	8	PAF	-
Phenylmethyl-TS	50	8	PAF	+
Diphenyl-TS	50/100	8-10	OA/PAF	+/+

OA=Ovalbumin; Signifikante Wirkung falls mindestens $p < 0,05$;
 TS=Thiosulfinat (synthetisiert); * in Allium cepa L. nachgewie-
 sen; Strukturübersicht s. S. 138

Tab. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der in vivo
 Untersuchungen auf Asthmaschutzwirkung

- Aus der Tabelle kann die Lokalisierung des Wirkprinzips ausgehend von der Chloroformausschüttelung des Zwiebelsafts über die Fraktion II sowie die Unterfraktionen II/2 und II/3 bis hin zu den Substanzen 1 und 2 verfolgt werden.
- Von den synthetischen Thiosulfinaten waren Dimethylthiosulfinat, Phenylmethylthiosulfinat und Diphenylthiosulfinat aktiv.
- Die Unwirksamkeit von Dipropylthiosulfinat, Diallylthiosulfinat, der Mischung aus Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat und von Methylphenylthiosulfinat zeigt, daß die Substituenten der Thiosulfinatfunktion für die in vivo Aktivität der Thiosulfinate bedeutsam sind.
- Substitution mit zumindest einem ungesättigten Rest wie in den Verbindungen 1, 2, 5, und 6 sowie in Phenylmethylthiosulfinat und Diphenylthiosulfinat dürfte eine Voraussetzung für die antiasthmatische Aktivität von Thiosulfinsäureestern sein.
- Die Erklärung für die Unwirksamkeit von Allicin sollte in der geringen Stabilität der Substanz liegen. Im sauren Magensaft ist während der Resorptionszeit von 45 min mit dem Abbau eines großen Teils der verabreichten Substanzmenge zu rechnen.
- Die Wirksamkeit des Dimethylthiosulfinats dürfte auf dessen bronchospasmolytischer Wirkung beruhen, die der des Theophyllins vergleichbar ist (Testergebnisse der Fa. Hoechst).
- Das Substitutionsmuster der Thiosulfinate beeinflusst auch die lokale Verträglichkeit der Substanzen. Im Gegensatz zu Diphenylthiosulfinat erwiesen sich Dipropylthiosulfinat und die Mischung aus Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat als stark reizend. Die Verabreichung der Substanzen an die Versuchstiere wurde dadurch sehr erschwert. Inwieweit lokale Reizung durch eine Substanz eine evtl. antiasthmatische Wirksamkeit überdecken kann, wurde nicht untersucht.
- Da Thiosulfinate in saurem Milieu z.B. des Magensaftes disproportionieren können, wurden Dimethylthiosulfinat und Diphenylthiosulfinat einer Säurebehandlung unterzogen. Die resultierenden Mischungen aus Disulfid und Thiosulfonat waren ebenso inaktiv wie die reinen Disulfide.

II.2.2. Ergebnisse und Diskussion der in vitro Versuche

II.2.2.1. Beeinflussung der Histaminfreisetzung aus humanen peripheren Leukozyten:

Von den getesteten synthetischen* Verbindungen (Dimethyl-, Dipropyl-, Diallyl- und Diphenylthiosulfinat) zeigten nur Allicin und Dipropylthiosulfinat bei 100 µM und Dipropylthiosulfinat bei 10 µM eine signifikante Verminderung der Histaminfreisetzung.

Test-substanz	% - Hemmung bei einer Konzentration von		
	100 µM	10 µM	1 µM
Dimethyl-TS	14 ± 29	20 ± 11	9 ± 17
Diphenyl-TS	37 ± 43	31 ± 17	6 ± 15
Diallyl-TS	59 ± 28*	15 ± 23	4 ± 28
Dipropyl-TS	77 ± 27**	49 ± 24*	10 ± 24

TS=Thiosulfinat; * = $p < 0,02$; ** = $p < 0,001$
Strukturübersicht s. S. 138;

Tab. 13: Verminderung der Histaminfreisetzung aus humanen, peripheren Leukozyten durch synthetische Thiosulfinate

II.2.2.2. Beeinflussung der Thromboxan B₂-Biosynthese im plättchenreichen Plasma (PRP):

Tabelle 14 zeigt die mit der Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft, den antiasthmatisch wirksamen Unterfraktionen, der Mischung der Substanzen 1 und 2, der Substanz 3 sowie mit synthetischem Dimethylthiosulfinat und Diphenylthiosulfinat erhaltenen Ergebnisse.

*Dimethylthiosulfinat und Dipropylthiosulfinat wurden in Allium cepa L. nachgewiesen. Diallylthiosulfinat ist das Hauptthiosulfinat in Allium sativum L..

Test- substanz	Konz. Thrombin	%Hemmung bei einer Konz. von		
		1,0 mg/ml	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml
Zwiebelextrakt	1 IU	91	75	53
Fraktion <u>II</u>	1 IU	86	96	88
Fraktion <u>II/2</u>	1 IU	95	94	59
Fraktion <u>II/3</u>	1 IU	98	84	70
Me-1-propenyl-TS	10 IU	95	84	45
Substanz <u>3</u>	10 IU	91	66	11
Dimethyl-TS	10 IU	61	45	27
Diphenyl-TS	10 IU	76	35	5

TS=Thiosulfinat; Strukturübersicht s. S. 138

Tab. 14: Einfluß von Zwiebelextrakt und -fraktionen sowie isolierten und synthetisierten Substanzen auf die TXB₂-Biosynthese im humanen PRP

Alle untersuchten Proben hemmten die Thromboxan-Biosynthese. Nicht immer sind klare Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten erkennbar. Auch können wegen der noch zu geringen Zahl untersuchter Substanzen keine Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt werden.

II.2.2.3. Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität:

Tabelle 15 gibt einen Überblick über die von den einzelnen Substanzen bei verschiedenen Konzentrationen ausgelösten Hemmwirkungen.

Test- substanz	%Hemmung* bei einer Konzentration von		
	50 μ M	10 μ M	5 μ M
Dimethyl-TS	0		
Methylpropyl-TS (Isomerengem.)	0		
Dipropyl-TS	0		
Diallyl-TS	67		
Methylphenyl-TS	41		
Phenylmethyl-TS	43		
Diphenyl-TS	71	28	
Me-1-propenyl-TS	100	76	
Pr-1-propenyl-TS	100	88	
Substanz <u>4/1</u>	100	85	66
Substanz <u>4/2</u>	100	100	77
Substanz <u>4/3</u>	100	100	64
Substanz <u>4/4</u>	100	100	78
Substanz <u>3</u>	n.b.		
Substanz <u>4</u>	0		

TS=Thiosulfinat; n.b.: nicht bestimmt;

*Mittelwerte aus mindestens zwei Messungen

Strukturübersicht s. S. 138;

Tab. 15: Einfluß von Thiosulfinaten, Dithianen und Cepaenen auf die PG-Biosynthese in vitro

Zusammenfassung der Ergebnisse im Cyclooxygenasehemmtest:
(Strukturübersicht s. S. 138)

- Die geringste Wirksamkeit zeigen kurzkettige, gesättigte Thiosulfinate wie Dimethylthiosulfinat, Dipropylthiosulfinat und die Mischung aus Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat. In Konzentrationen von 50 μM und niedriger bleibt die Cyclooxygenaseaktivität durch diese Substanzen unbeeinflusst.
- Eine deutliche Steigerung der inhibitorischen Wirkung von Thiosulfinaten auf die Cyclooxygenase wird durch Einführung ungesättigter Gruppen erreicht.
- Beide Monophenylthiosulfinate zeigen dabei mit IC_{50} -Werten von etwas über 50 μM (41% und 43% Hemmwirkung bei 50 μM) identische Aktivität. Stellungsisomerie des Sauerstoffs an der Thiosulfinatfunktion scheint sich auf die Cyclooxygenasehemmaktivität nicht auszuwirken.
- Etwas stärkere Aktivität als die Monophenylthiosulfinate entfalten Diphenylthiosulfinat (bei 50 μM 72% Inhibition) und der 2-fach β,γ -ungesättigte Thiosulfinsäure-ester Allicin (67% Inhibition bei 50 μM). Di-2-propenylthiosulfinat und Diphenylthiosulfinat sind damit gleich aktiv.
- Die aus Allium cepa L. isolierten cis/trans-Isomerengemische Propyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat (Substanzen 5 und 6) bzw. Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat (Substanzen 1 und 2) haben als einfach α,β -ungesättigte Thiosulfinate interessanterweise noch stärkere Hemmaktivität als zweifach β,γ -ungesättigt oder einfach aromatisch substituierte Thiosulfinsäureester. Die Mischung 1+2 zeigt bei 10 μM eine Hemmung von 76%, die Mischung 5+6 von 88%. Mit IC_{50} -Werten zwischen 5 und 10 μM sind diese Substanzen als potente Cyclooxygenaseinhibitoren anzusehen.
- Da sich die Verbindungen 5 und 6 (Propyl-1-propenylthiosulfinate) bzw. 1 und 2 (Methyl-1-propenylthiosulfinate) nur durch die Doppelbindung in α -Stellung von Dipropylthiosulfinat bzw. Methylpropylthiosulfinat unterscheiden, ist darin der Grund für die beachtliche Zunahme der Aktivität zu sehen.

- Wenn die Doppelbindung in α -Stellung eine Voraussetzung für gute in vitro Aktivität der Thiosulfinate ist, stellt sich die Frage nach dem Einfluß der Konfiguration der Doppelbindung. Die Frage muß vorerst noch unbeantwortet bleiben. Es ist zwar möglich, jeweils beide Isomere zu trennen, doch erfolgt schon während der Aufarbeitung der Fraktionen und damit sicher auch vor und während der Inkubation Isomerisierung, sodaß keine exakten Aussagen über das Verhältnis der Isomere im Inkubationsansatz möglich sind.
- Die stärkste Hemmwirkung aller untersuchten Substanzen auf die Cyclooxygenase zeigten die Cebaene aus Allium cepa L.. Alle vier Substanzen zeigen Aktivität derselben Größenordnung. In einer Konzentration von 5 μ M wurden Hemmwirkungen zwischen 64% bei 4/3 und 78% bei 4/4 ermittelt. Die IC₅₀-Werte liegen für die Substanzen 4/1 bis 4/4 demnach unter 5 μ M. Die 2-fach ungesättigten Substanzen 4/2 und 4/4 sind geringfügig wirksamer als 4/1 und 4/3. Zwischen den Diastereomerenpaaren 4/1 und 4/3 bzw. 4/2 und 4/4 besteht kein Aktivitätsunterschied.
- Die mit den Cebaenen erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den Resultaten, die in unserem Arbeitskreis kürzlich mit den aus Allium sativum L. isolierten Ajoenen erzielt worden waren. Die Mischung aus E- und Z-Ajoen hatte sich bei in vitro Untersuchungen als starker Hemmstoff von Cyclooxygenase und 5-Lipoxygenase erwiesen [42]. Mit einem IC₅₀-Wert von 5,1 μ M lag die Aktivität der Ajoene im Cyclooxygenasehemmtest geringfügig unter der der Cebaene.
- Die Cebaene aus Allium cepa L. gehören damit zu den stärksten, bisher gefundenen, pflanzlichen Cyclooxygenasehemmstoffen. Zum Vergleich zeigt Tabelle 16 die IC₅₀-Werte von einigen potenten, kürzlich getesteten Pflanzeninhaltsstoffen [142]:

Substanz	Eugenol	Capsaicin	Carvacrol	Cepaene
IC ₅₀ -Wert (μ M)	11,0	3,8	4,0	< 5,0

Tab. 16: IC₅₀-Werte potenter Cyclooxygenasehemmstoffe
pflanzlicher Herkunft

II.2.2.4. Beeinflussung der 5-Lipoxygenaseaktivität:

Die Tabelle 17 gibt eine Übersicht über die 5-Lipoxygenase-Hemmwirkungen derselben Verbindungen, die im Cyclooxygenasetest eingesetzt worden waren.

Test-substanz	%Inhibition* bei einer Konzentration von			
	20 μM	2,5 μM	1,0 μM	0,5 μM
Dimethyl-TS	5			
Methylpropyl-TS (Isomerengem.)	6			
Dipropyl-TS	10			
Diallyl-TS		27		
Methylphenyl-TS		100	17	
Phenylmethyl-TS		100	30	
Diphenyl-TS		100	77	43
Me-1-propenyl-TS		75	35	8
Pr-1-propenyl-TS		96	57	15
Substanz <u>4/1</u>		100	79	39
Substanz <u>4/2</u>		100	100	73
Substanz <u>4/3</u>		100	75	46
Substanz <u>4/4</u>		100	100	76
Substanz <u>3</u>	16			
Substanz <u>4</u>	0			

TS=Thiosulfinat; Strukturübersicht s. S. 138;

*Mittelwert aus mindestens zwei Messungen;

Tab. 17: Einfluß von Thiosulfinaten, Dithianen und Cepaenen auf die 5-Lipoxygenaseaktivität in vitro

Zusammenfassung der Ergebnisse im Lipoxygenasehemmtest:

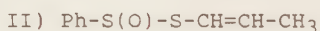
(Strukturübersicht s. S. 138)

- Insgesamt wurden IC_{50} -Werte erhalten, die deutlich unter den halbmaximalen Hemmkonzentrationen für die Cyclooxygenase-präparation aus Schafsamensamenblasen liegen. Wiederum haben Thiosulfinate mit kurz-kettigen, gesättigten Substituenten und die Dithianderivate (Substanzen 3 und 4) die geringste Aktivität. Sie zeigen bis zu einer Konzentration von 20 μM keine oder minimale Hemmwirkung.
- Analog zum Cyclooxygenasehemmtest hat Substitution der Thiosulfinatfunktion mit aromatischen, β,γ -oder α,β -ungesättigten Resten einen starken Anstieg der Hemmwirkung zur Folge.
- Das Diallylthiosulfinat fällt allerdings in seiner Aktivität gegenüber Methylphenyl- und Phenylmethylthiosulfinat etwas ab. Ursache hierfür könnte die geringe Stabilität des Allicins sein. Unter den Inkubationsbedingungen des 5-Lipoxygenasehemmtestes (37°C!) könnte Allicin schneller verändert werden als im Cyclooxygenaseinkubatur (23°C!).
- Da Methylphenylthiosulfinat und Phenylmethylthiosulfinat ähnlich starke Hemmwirkung zeigen, dürfte auch hier die Stellungsisomerie wiederum keinen Einfluß auf die Aktivität besitzen. Alle drei phenylsubstituierten Thiosulfinate, vor allem aber das Diphenylthiosulfinat mit einem IC_{50} -Wert von unter 1,0 μM , sind als sehr potente 5-Lipoxygenaseinhibitoren einzustufen.
- Die aus Allium cepa L. isolierten cis/trans-Isomerengemische der α,β -ungesättigten Thiosulfinate sind mit IC_{50} -Werten um 1,0 μM (Substanzen 5+6) bzw. 1,0-2,5 μM (Substanzen 1+2) ebenfalls starke 5-Lipoxygenasehemmstoffe. Die Frage nach unterschiedlicher Aktivität der cis/trans-Isomeren in der Gruppe der α,β -ungesättigten Thiosulfinate muß aus dem im vorherigen Kapitel angegebenen Grund unbeantwortet bleiben.

- Die etwas höhere Aktivität der Propyl-1-propenylthiosulfinate gegenüber den Methyl-1-propenylthiosulfinate mag durch den größeren lipophilen Molekülanteil in den ersten Verbindungen bedingt sein.

Hierfür oder für Aktivitätssteigerung durch einen zweiten, ungesättigten Substituenten spricht auch die erhöhte Hemmwirkung von Diphenylthiosulfinat gegenüber Methylphenyl- und Phenylmethylthiosulfinat.

- Zusammenfassend folgt aus obigen Daten, daß zwar alle Thiosulfinate 5-Lipoxygenasehemmstoffe sind, aber erst durch die Einführung (v.a. α,β -) ungesättigter und lipophiler (aromatischer) Substituenten zu besonders potenten Lipoxygenasehemmern werden. Von großem Interesse wäre in diesem Zusammenhang die Kenntnis der Aktivität von folgenden zu synthetisierenden Thiosulfinate:



- Die besten Hemmstoffe pflanzlicher Herkunft der 5-Lipoxygenase in Schweineleukozyten, die im Rahmen dieser Arbeit aufgefunden wurden, sind die aus Allium cepa L. isolierten Cepaene.

Tabelle 18 gibt eine Übersicht der Hemmaktivitäten der Proben 4/1 bis 4/4, die Cepaene darstellen.

Substanz	<u>4/1</u>	<u>4/2</u>	<u>4/3</u>	<u>4/4</u>
Konzentration	Hemmung in %			
1,0 μM	70	100	75	100
0,5 μM	39	73	46	76

Tab. 18: Hemmwirkungen der Substanzen 4/1 bis 4/4 auf die 5-Lipoxygenaseaktivität bei 1,0 μM und 0,5 μM

- Eine weitere Doppelbindung in α -Stellung zur Disulfidbrücke bei den Verbindungen 4/2 und 4/4 führt stärker als beim Cyclooxygenasehemmtest zu einer Aktivitätssteigerung.
- Wie im Cyclooxygenasehemmtest zeigen Diastereomerenpaare identische Hemmwirkung.
- Für die zu den Cypaenen strukturell eng verwandten Ajoene aus Allium sativum L. war in unserem Arbeitskreis im 5-Lipoxygenasehemmtest ein IC_{50} -Wert von 1,6 μM ermittelt worden [42]. Damit ist die Aktivität der Ajoene geringfügig niedriger als die der Cypaene. Daraus ist wiederum die Bedeutung der Doppelbindung in α -Stellung zu Sulfoxid- oder Thiosulfinatfunktionen für die biologische Aktivität der Substanzen erkennbar:
- Verbindungen mit einer Doppelbindung in α -Stellung zur Sulfoxid-Gruppe (4/1 und 4/3) sind bereits aktiver als die Ajoene die zwei Doppelbindungen in β -Stellung zu Sulfoxid und Disulfid und eine Doppelbindung in α -Stellung zum Disulfid aufweisen.
- Aussagen über Wirkungsunterschiede zwischen gerad- und verzweigtkettigen Verbindungen können anhand der vorliegenden Daten nicht gemacht werden.

II.2.2.5. Beeinflussung der PAF-induzierten Chemolumineszenz humaner neutrophiler Granulozyten (PMNL):

Alle getesteten Thiosulfinate hemmen im Konzentrationsbereich von $0,5\text{-}5 \times 10^{-6}$ mol/l dosisabhängig die PAF-induzierte Chemolumineszenz (CL) humaner PMNL (Tabelle 19).

Test-substanz	% -Hemmung* bei einer Konzentration von		
	4,0 μM	2,5 μM	1,0 μM
Methylpropyl-TS (Isomerengem.)	43	27	n.b.
Dipropyl-TS	61	29	n.b.
Me-1-propenyl-TS	60	46	0
Pr-1-propenyl-TS	85	76	41
Diallyl-TS	82	44	n.b.
Phenylmethyl-TS	90	28	0
Methylphenyl-TS	n.b.	93	62
Diphenyl-TS	92,4	36,0	n.b.

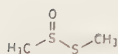
n.b.: nicht bestimmt; * Mittelwert aus mindestens drei Messungen

Tab. 19: Einfluß von Thiosulfinaten auf die PAF-induzierte Chemolumineszenz humaner PMNL

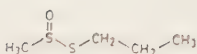
Zusammenfassung der Ergebnisse im Chemolumineszenztest: (Strukturübersicht s.S. 138)

- In Konzentrationen, in denen die PAF-induzierte CL dosisabhängig vermindert wird, zeigt keines der untersuchten Thiosulfinate im Purin/Xanthinoxidase-System Radikalfänger-eigenschaften. Bei ca. 10-fachen Konzentrationen vermindern lediglich Diallylthiosulfinat (48% bei 60 μM) und Dipropylthiosulfinat (22% bei 60 μM) im zellfreien Testsystem die CL.
- Thiosulfinate vermindern demnach entweder die Stimulierung der PMNL durch PAF oder sekundäre Effekte der PAF-Stimulierung.

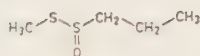
- Eine Struktur-Wirkungs-Beziehung in der Klasse der Thiosulfinate ist hier nicht ebenso klar erkennbar wie im Cyclooxygenase- und 5-Lipoxygenasehemmtest.
- Alle Thiosulfinate zeigen im selben Konzentrationsbereich von 0,5-5,0 μM Hemmaktivität. Vergleicht man die Aktivitäten bei 2,5 μM , so ist ersichtlich, daß ungesättigt (α,β - und β,γ -) substituierte Verbindungen aktiver sind als solche, die ausschließlich Alkylreste tragen.
- Charakteristisch für phenylsubstituierte Thiosulfinate scheint die schnelle Aktivitätszunahme mit steigender Konzentration zu sein. So steigt z.B. die Hemmwirkung von Phenylmethylthiosulfinat von 28,7% bei 2,5 μM auf 90,9% bei 4,0 μM . Methylphenylthiosulfinat und Diphenylthiosulfinat zeigen eine ähnlich steile Dosis-Wirkungs-Kurve.
- Überraschend ist die Hemmwirkung von Methylphenylthiosulfinat: Es übertrifft bei 2,5 μM deutlich die Wirksamkeit des stellungsisomeren Phenylmethylthiosulfinats (93,4% : 28,7%). Anders als bei der Beeinflussung der Cyclooxygenase- und 5-Lipoxygenaseaktivität scheint im Falle asymmetrisch substituierter Verbindungen bei der Beeinflussung der PAF-induzierten CL der PMNL die Position des Sauerstoffatoms der Thiosulfinatfunktion wichtig zu sein. Weitere Untersuchungen mit asymmetrisch substituierten Substanzen müssen den Einfluß der Stellung des Sauerstoffatoms klären.



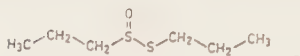
Dimethyl-TS (n,s)



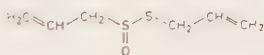
Methylpropyl-TS (n,s)



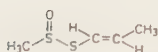
Propylmethyl-TS (n,s)



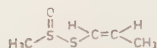
Dipropyl-TS (i,s)



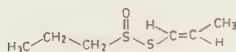
Diallyl-TS (s)



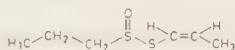
Methyl-trans-1-propenyl-TS (i)



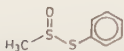
Methyl-cis-1-propenyl-TS (i)



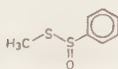
Propyl-trans-1-propenyl-TS (i)



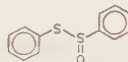
Propyl-cis-1-propenyl-TS (i)



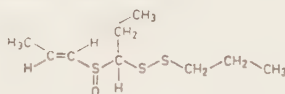
Methylphenyl-TS (s)



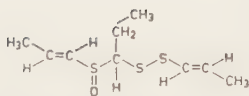
Phenylmethyl-TS (s)



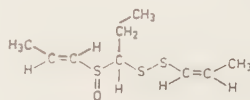
Diphenyl-TS (s)



Verbindung 4/1 (i)
(4/3: diastereomer)



Verbindung 4/2 A (i)
(4/4 A: diastereomer)



Verbindung 4/2 B (i)
(4/4 B: diastereomer)

Abb. 47: Strukturübersicht der getesteten Verbindungen;
i: aus A.C.L. isoliert; n: in A.C.L. nachgewiesen;
s: synthetisiert;

II.3. Zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse der pharmakologischen in vitro Untersuchungen (Strukturübersicht s.S. 138)

II.3.1. Thiosulfinate:

Die aus Allium cepa L. isolierten und synthetisierten Thiosulfinate hemmen die Thromboxan B₂-Biosynthese in humanem, plättchenreichen Plasma, die Leukotrien- und Prostaglandin-Biosynthese und die PAF-induzierte Chemolumineszenz humaner, neutrophiler Granulozyten unterschiedlich stark. Die Histamin-freisetzung aus humanen, peripheren Leukozyten wird nur durch Diallylthiosulfinat und Dipropylthiosulfinat signifikant vermindert.

In der Substanzgruppe der Thiosulfinate gibt es Unterschiede in der relativen Wirkungsstärke:

Im 5-Lipoxygenasehemmtest zeigt das Diphenylthiosulfinat, im Cyclooxygenasehemmtest die Propyl-1-propenylthiosulfinate, bei der Verminderung der Histaminfreisetzung Dipropylthiosulfinat und bei der Hemmung der PAF-induzierten Chemolumineszenz humaner PMNL Methylphenylthiosulfinat die höchste Wirksamkeit. Es ist demzufolge nicht möglich, ein Thiosulfinat mit "höchster biologischer Aktivität" zu benennen. Jedoch erhöht i.d.R. Substitution mit (α,β)-ungesättigten und aromatischen Resten die in vitro Aktivität der Verbindungen.

Von den in vitro Wirkungen der Thiosulfinate kommt im Hinblick auf die Beeinflussung asthmatischer Prozesse den Eingriffen in den Arachidonsäurestoffwechsel die größte Bedeutung zu. Ungesättigt substituierte Thiosulfinate zeigen in vitro bereits ab einer Konzentration von 1 μM deutliche Hemmwirkung auf die 5-Lipoxygenase. Um eine vergleichbare Hemmung der Cyclooxygenaseaktivität zu erreichen, sind Konzentrationen nötig, die etwa um den Faktor 5 (α,β -ungesättigte Thiosulfinate) bis Faktor 25-50 (phenylsubstituierte Thiosulfinate) höher liegen. Daraus folgt, daß, zumindest in vitro, die Biosynthese von Mediatoren der asthmatischen und allergischen Formenkreise (v.a.: LTB₄, SRS-A, HETE's) effektiv unterdrückt wird.

Von der vorhandenen cyclooxygenasehemmenden Aktivität der Substanzen sollte bei entsprechender Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik zusätzlich eine antiinflammatorische Wirkung ausgehen, ohne daß ein "Arachidonsäure-shift" in den Lipoxygenaseweg zu erwarten ist. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität an einer zellfreien Enzympräparation, die Beeinflussung der 5-Lipoxygenaseaktivität dagegen in intakten Leukozyten untersucht wurde. Bei Verwendung eines zellfreien 5-Lipoxygenasesystems wäre das Verhältnis von Cyclooxygenasehemmung zu 5-Lipoxygenasehemmung noch stärker zugunsten der 5-Lipoxygenasehemmung verschoben.

Inwieweit die 5-Lipoxygenasehemmung spezifisch ist, oder sich auch auf andere Lipoxygenasen erstreckt, wurde nicht untersucht.

Ebenso wurde nicht geprüft, ob die Verminderung der TXB₂-Biosynthese in humanem PRP allein auf die Cyclooxygenasehemmung durch die Thiosulfinate zurückzuführen ist, oder ob die Thromboxan- Synthase ebenfalls inhibiert wird.

Obwohl Histamin selbst als Asthamediator nur eine untergeordnete Rolle spielt, könnte die Verminderung der Histaminfreisetzung durch Thiosulfinate für eine Unterdrückung der Startreaktion des Asthmaanfalls - der Mastzelldegranulation - bedeutsam sein. Zu klären ist allerdings, ob Allicin und Dipropylthiosulfinat auch die Histaminfreisetzung aus humanen Mastzellen vermindern.

Die Bedeutung der Reduzierung der PAF-induzierten CL humaner PMNL durch Thiosulfinsäureester ist bis dato nicht sicher einzuschätzen, da nicht geklärt ist, ob PAF in vivo der entscheidende Mediator zur Aktivierung der PMNL ist.

II.3.2. Cepaene:

Die aus Allium cepa L. isolierten Cepaene zeigen sowohl im Cyclooxygenase- als auch im 5-Lipoxygenasehemmtest die höchste Aktivität aller untersuchten Verbindungen. Die IC₅₀-Werte liegen im 5-Lipoxygenasehemmtest um 0,5 µM, im Cyclooxygenasehemmtest zwischen 5 und 10 µM.

Ob die Cepaene die Histaminfreisetzung aus peripheren Leukozyten, die TXB₂-Biosynthese im plättchenreichen Plasma und/oder die PAF-induzierte Chemolumineszenz humaner PMNL beeinflussen, wurde nicht untersucht. Allerdings ist aufgrund der inhibitorischen Wirkung der Substanzen auf die Cyclooxygenase zumindest mit einer Verminderung der TXB₂-Biosynthese zu rechnen. Die Cepaene standen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um sie auf Asthmaschutzwirkung in vivo zu untersuchen.

II.4. Versuch einer Korrelation zwischen Asthmaschutzwirkung in vivo und den in vitro Testergebnissen:

Die Korrelation zwischen der 5-Lipoxygenasehemmung in vitro und der Schutzwirkung gegen die experimentell ausgelöste Bronchokonstriktion bei Meerschweinchen ist für die meisten der untersuchten Fraktionen und Substanzen gegeben. Alle im Tiermodell aktiven Substanzen - mit Ausnahme des Dimethylthiosulfinats - verursachten auch eine starke Hemmung der 5-Lipoxygenaseaktivität in vitro. (100%-ige Hemmung in Konzentrationen unter 5 µM).

Die Wirksamkeit von Dimethylthiosulfinat in vivo, trotz fehlender starker Hemmwirkung auf die 5-Lipoxygenase, ist auf die Theophyllin-ähnliche broncholytische Wirkung der Substanz zurückzuführen.

Umgekehrt zeigten Substanzen mit starker inhibitorischer Wirkung auf die 5-Lipoxygenase i.d.R. auch antiasthmatische Wirksamkeit in vivo. Dies gilt nicht für Methylphenylthiosulfinat und Diallylthiosulfinat.

Die Ursache für die fehlende Asthmaschutzwirkung von Allicin könnte in der Instabilität der Substanz liegen. Der Grund für die Unwirksamkeit von Methylphenylthiosulfinat ist bisher noch unklar.

Eine selektive, oder die 5-Lipoxygenasehemmung überwiegende, Cyclooxygenasehemmung ist bei potentiell antiasthmatischen Wirkstoffen nicht erwünscht. Daher muß im Cyclooxygenasehemmtest geprüft werden, ob der Testsubstanz entweder Hemmwirkung

auf die Cyclooxygenase fehlt, oder ob diese, falls vorhanden, schwächer ist, als die inhibitorische Wirkung auf die 5-Lipoxygenase. Diese Bedingung ist für die antiasthmatisch wirksamen Thiosulfinsäureester erfüllt.

Die Verminderung der Histaminfreisetzung aus humanen peripheren Leukozyten in vitro durch Allicin und Dipropylthiosulfinat reicht offensichtlich bei einmaliger Applikation vor der Asthmaprovokation für eine Asthmaschutzwirkung in vivo nicht aus. Allerdings könnte diese in vitro Aktivität bei prophylaktischer Langzeitanwendung analog zur Cromoglicinsäure Bedeutung erlangen.

Der Histamin-Release-Test ist somit nur als zusätzliches Screeningsystem für die Auffindung potentiell antiasthmatisch wirksamer Substanzen einzuordnen.

Es hat sich aber gezeigt, daß zumindest in der Substanzklasse der Thiosulfinate der 5-Lipoxygenasehemmtest zusammen mit dem Cyclooxygenasehemmtest als Screeningsystem geeignet war. Die Testsysteme auf Verminderung der Histaminfreisetzung und der PAF-induzierten Chemolumineszenz können zusätzliche Informationen liefern.

Allerdings können Substanzen auch durch eine Hemmwirkung auf die Leukozytenchemotaxis und die Sekretion des Major Basic Proteins sowie durch broncholytische Eigenschaften asthmatische Zustände positiv beeinflussen.

Eine Gruppe von in vitro Systemen zum Screening von Pflanzeneinhaltsstoffen auf antiasthmatische Wirksamkeit sollte daher, wenn möglich, auch Systeme zur Erfassung dieser Wirkqualitäten enthalten.

C. Zusammenfassung:

- 1) Ausgehend von einem im Tiermodell antiasthmatisch wirkenden Ether- bzw. Chloroformextrakt eines Allium cepa-Preßsaftes wurden aus den aktivsten Fraktionen durch Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) an Kieselgel sieben Verbindungen isoliert, die zwei Stoffklassen angehören.
- 2) Bei fünf Verbindungen handelt es sich um Thiosulfinsäure-ester der nachstehenden Strukturen:

- Methylthiosulfinsäure-S-trans-1-propenylester
- Methylthiosulfinsäure-S-cis-1-propenylester
- n-Propylthiosulfinsäure-S-cis-1-propenylester
- n-Propylthiosulfinsäure-S-trans-1-propenylester
- n-Propylthiosulfinsäure-S-n-propylester

Die α,β -ungesättigten Thiosulfinate waren bisher weder aus Pflanzen isoliert noch synthetisiert worden. Sie sind als die antiasthmatischen Wirksubstanzen des Zwiebelextrakts anzusehen.

- 3) Mit zwei weiteren Verbindungen, den epoxidierten 1,4-Dithianderivaten,
 - cis-3,4-Dimethyl-7-oxa-2,5-dithia bicyclo [4.1.0.] heptan
 - trans-3,4-Dimethyl-7-oxa-2,5-dithia bicyclo [4.1.0.] heptan

wurden Vertreter einer neuen Naturstoffklasse aufgefunden, für die bisher noch keine spezifische pharmakologische Wirkung nachgewiesen werden konnte.

- 4) Aus einer weiteren Unterfraktion mit starker Hemmwirkung auf die Cyclo- und 5-Lipoxygenase wurden sechs bisher nicht bekannte α -Sulfinyldisulfide (Alloene) isoliert:
- trans-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2-decen-4-S-oxid
 - trans,trans-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2,8-decadien-4-S-oxid
 - trans,cis-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2,8-decadien-4-S-oxid
 - und die drei, zu den genannten, diastereoisomeren Verbindungen
- 5) Durch vergleichende HPLC-Untersuchungen mit selbst synthetisierten Referenzsubstanzen konnten Dimethyl-, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat als weitere Inhaltsstoffe des Zwiebelextraktes identifiziert werden.
- 6) Für die Hauptthiosulfinate des Zwiebelextraktes, Dimethylthiosulfinat und die Mischung aus Methyl-cis/trans-1-propenylthiosulfinat, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat wurde eine HPLC-Methode zur Gehaltsbestimmung mit externem Standard entwickelt und in Extrakten aus 10 verschiedenen Drogenchargen der Gehalt an Dimethylthiosulfinat mit 4,0% bis 7,4% (G/G) bestimmt.
- Für Methyl-cis/trans-1-propenyl-, Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat, berechnet als Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat ergaben sich Werte zwischen 12,4% und 26,1% (G/G).

- 7) Stabilitätsuntersuchungen, durchgeführt mit einem Rohextrakt ergaben, daß
- bei Langzeitlagerung bei Raumtemperatur ein rascher, bei +4°C ein langsamerer und bei -20°C/-70°C kein Abbau der Hauptwirksubstanzen stattfindet.
 - bei Streßtests bei 37°C und 60°C die Hauptwirksubstanzen in methanolischer Extraktlösung stabiler sind als in ungelöstem Extrakt bzw. in ethanolischer Extraktlösung.
- 8) Zur Klärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und um ihr chromatographisches Trennverhalten zu untersuchen, wurden die folgenden symmetrisch und asymmetrisch substituierten Thiosulfinsäureester synthetisch dargestellt:
- symmetrisch substituierte Thiosulfinate:
Dimethyl-, Dipropyl-, Diallyl- und Diphenylthiosulfinat
 - asymmetrisch substituierte Thiosulfinate:
Methylpropyl-, Propylmethyl-, Methylphenyl-, und Phenylmethylthiosulfinat
- 9) Alle isolierten und synthetisierten Verbindungen waren zusammen mit weiteren strukturell verwandten schwefelhaltigen Verbindungen in einem universell anwendbaren HPLC-System chromatographierbar. Die Zusammenhänge zwischen der Struktur der Substanzen und ihrer Retentionszeit auf einer RP-Säule werden diskutiert.
- 10) Von den synthetisierten Verbindungen zeigten Dimethylthiosulfinat, Diphenylthiosulfinat und Phenylmethylthiosulfinat im Tierexperiment eine Asthmaschutzwirkung.

- 11) Durchgeführte in vitro Untersuchungen zeigen, daß
- alle Verbindungen (außer Dimethylthiosulfinat), die in vivo wirksam waren, sich als starke Hemmstoffe der 5-Lipoxygenase erwiesen. In höheren Konzentrationen wurde auch die Cyclooxygenase inhibiert.
 - Dimethylthiosulfinat zeigte ähnlich starke bronchodilatorische Aktivität wie Theophyllin.
- 12) Sowohl im Cyclo- als auch im 5-Lipoxygenasehemmtest waren Thiosulfinate mit gesättigten Substituenten nur schwach aktiv, während die Einführung von ungesättigten oder aromatischen Resten zu erheblicher Steigerung der Aktivität in beiden in vitro Systemen führte.
- 13) Zwiebelextrakte und -fraktionen zeigten darüberhinaus eine Hemmwirkung auf die TXB₂-Biosynthese in humanem PRP. Alle Thiosulfinate verminderten die PAF-induzierte Chemolumineszenz humaner PMNL während Diallylthiosulfinat und Dipropylthiosulfinat zusätzlich die Histaminfreisetzung aus humanen peripheren Leukozyten inhibierten.
- 14) Die Cepaene (Verbindungen 4/1 bis 4/4 B) zeigten von allen isolierten Substanzen die stärkste inhibitorische Wirkung sowohl auf die Cyclo- als auch auf die 5-Lipoxygenase. Sie gehören zu den potentesten bisher bekannten dualen Inhibitoren beider Enzymsysteme.

D. Experimenteller Teil

I. Herkunft des Drogenmaterials:

- Zwiebeln der gelben Varietät von Allium cepa L. zur Extraktbereitung und Isolierung wurde von der Fa. Schmidteder, Großmarkthalle München bezogen. Herkunft: Polen.
- Zwiebeln der gelben, weißen und roten Varietät von Allium cepa L. für vergleichende HPLC-Untersuchungen und 10 Chargen Zwiebeln der gelben Varietät für die Gehaltsbestimmungen stammten aus verschiedenen kommerziellen Quellen.
Als Ursprungsländer waren Polen, Ungarn, Jugoslawien und die BRD angegeben worden.

II. Allgemeine Arbeitsmethoden

II.1. Analytische Dünnschichtchromatographie

II.1.1. Adsorbentien:

- Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten (20x20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Fa. Merck, Darmstadt.
- Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC) 10x20 cm, Fa. Merck, Darmstadt.

II.1.2. Laufmittelsysteme:

- Charakterisierung der Chloroformausschüttelung aus Zwiebelsaft:
Toluol/Ethylacetat (10:3)
- Trennung von Dithianen und Thiosulfinaten:
Chloroform/Aceton (100:4)
Dichlormethan/Aceton (100:1)
- Trennung der Cepaene:
n-Hexan/Ethylacetat (10:3)
- Trennung phenylsubstituierter Thiosulfinat:
Dichlormethan

- Trennung n-propylsubstituierter Thiosulfinate:
n-Hexan/Ethylacetat (10:2)

II.1.3. Detektionsmethoden:

- UV 254: Thiosulfinate und Cepaene erzeugen Fluoreszenzminderung
- Terpenoide Verbindungen und Dithiane:
Vanillin/Schwefelsäure:
Nach Besprühen mit 5% ethanol. H_2SO_4 und 1% ethanol. Vanillinlsg. wird 10 min auf ca. $110^\circ C$ erhitzt und danach im Tageslicht ausgewertet.
- schwefelhaltige Verbindungen allgemein:
0,5% wässrige Palladium(II)-chloridlsg. (gelöst unter Zusatz von ca. 1% HCl konz.).
Auswertung im Tageslicht. Die meisten schwefelhaltigen Verbindungen reagieren mit Braunfärbung.
- Thiosulfinate und Verbindungen mit Sulfoxidstruktur (z.B. Cepaene):
Alkalische Natrium-Nitroprussidnatriumlösung:
Nach Besprühen mit 5% wässriger Natrium-Nitroprussidnatriumlösung und 10% ethanolischer NaOH erhält man im Tageslicht rote, rasch verblassende Zonen.

II.2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

II.2.1. Apparative Daten:

Liquid Chromatograph HP 1090 mit HP 1040 A Photodiodenarray-Detektor, kombiniert mit HP 85 B Tischcomputer, HP 9121 Diskettenlaufwerk und HP 7470 A Plotter (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn).

II.2.2. Lösungsmittel:

Acetonitril (Chrom Ar-Qualität) der Fa. Promochem, Wesel und destilliertes Wasser.

II.2.3. Trennsysteme:

Für alle Trennsysteme wurde verwendet:

- Säule: Hibar 125-4 LiChrospher 100 CH-18/2 (5 μ M),
Fa. Merck, Darmstadt
- Durchfluß: 1 ml/min

- HPLC-System 1: Universalsystem für schwefelhaltige Verbindungen
Elutionsmittel: A: Wasser; B: Acetonitril
Gradient: von 20% B auf 80% B in 30 min linear
UV-Detektion bei 200 nm

- HPLC-System 2: Trennung sterolhaltiger Zwiebelextrakte
Elutionsmittel: A: Wasser; B: Acetonitril
Gradient: von 20% B auf 60% B in 30 min (linearer Anstieg), dann in 10 min auf 100% B (linearer Anstieg) und weitere 10 min isokratisch mit 100% B
UV-Detektion bei 200 nm

- HPLC-System 3: Trennung von Methylpropyl-/Propylmethyl-thiosulfinat und Methyl-cis/trans-1-propenyl-thiosulfinat
Elutionsmittel: A: Wasser; B: Acetonitril
15% B isokratisch
UV-Detektion bei 200 nm

- HPLC-System 4: Trennproblem aus System 3 mit anschließender Extrakttrennung
Elutionsmittel: A: Wasser; B: Acetonitril
Gradient: 15% B isokratisch für 10 min, dann in 30 min auf 80% B (linearer Anstieg)
UV-Detektion bei 200 nm

- HPLC-System 5: Trennung von sulfidischen Verbindungen und von Thiolen
 Elutionsmittel: A: Wasser; B: Acetonitril
 Beide unter Zusatz von 1% 0,1n H_3PO_4
 Gradient: 30% B in 20 min auf 80% B (linearer Anstieg)
 UV-Detektion bei 200 nm

- HPLC-System 6: Trennung der Prostaglandine im Cyclooxygenasehemmtest
 Elutionsmittel A: Acetonitril/Wasser (30:70)
 Elutionsmittel B: Acetonitril/Wasser (80:20)
 Beide unter Zusatz von 1% (V/V) 0,1n H_3PO_4
 Gradient: 0% B in 20 min auf 100% B (linearer Anstieg), dann 12 min 100% B
 Det.: Radioaktivitätsmonitor

- HPLC-System 7: Trennung der Eicosanoide im 5-Lipoxygenasehemmtest
 Elutionsmittel A: Acetonitril/Wasser (50:50)
 Elutionsmittel B: Acetonitril/Wasser (90:10)
 Beide unter Zusatz von 1% (V/V) 0,1n H_3PO_4
 Gradient: 0% B in 20 min auf 100% B (linearer Anstieg), dann 10 min 100% B
 Det.: Radioaktivitätsmonitor

II.3. Fliehkraftbeschleunigte präparative Schichtchromatographie

II.3.1. Gerät und Arbeitsweise:

Fliehkraft-Chromatographie-System "Chromatotron" Fa. Harrison Research, USA. Eine Glasplatte ($\varnothing=24$ cm) wird mit Adsorbens beschichtet. Nach je 24-stündigem Trocknen bei RT und 60°C wird die Schicht geglättet und am Plattenrand sowie im Zentrum entfernt, sodaß eine ringförmige Beschichtung verbleibt.

Die Platte rotiert mit 750 U/min. Das zu trennende

Substanzgemisch wird gelöst und mittels einer Pasteurpipette bei rotierender Platte im Inneren des Adsorbensrings aufgetragen. Nach Abdunsten des Lösungsmittels wird mit zutropfendem Laufmittel eluiert. Die Fraktionierung erfolgt von Hand am Auslaß der geeigneten Apparatur.

II.3.2. Adsorbens:

Kieselgel 60 PF₂₅₄ gipshaltig, Fa. Merck, Darmstadt. Die Verwendung von Kieselgel mit Fluoreszenzindikator erleichtert die Fraktionierung, da die Wanderung von fluorezenzmindernden Zonen auf der Platte beobachtet werden kann.

II.3.3. Elutionsmittel:

Die zur Grobtrennung des Extraktes und zur Reinigung synthetischer Thiosulfinate verwendeten Laufmittel werden dort angegeben.

II.4. Säulenchromatographie unter Stickstoffdruck: "Flash"-Chromatographie

II.4.1. Verfahrensweise:

Das Adsorbens wird mit dem Elutionsmittel zu einer gleichmäßigen, luftblasenfreien Suspension verrührt. Die Suspension wird dann in die schräggestellte Säule, die unten Glaswolle und etwas Elutionsmittel enthält, luftblasenfrei eingegossen.

Danach wird zur Erhöhung der Tropfgeschwindigkeit über ein Ventil mit Hilfe von Stickstoff ein Überdruck von etwa 2 bar angelegt und solange mit Laufmittel nachgewaschen, bis die Säulenhöhe konstant bleibt. Das zu trennende Substanzgemisch wird in möglichst wenig Eluens gelöst und mit einer Pasteurpipette aufgetragen. Die Zufuhr des Fließmittels erfolgt mittels eines Lösungsmittelreservoirs, das über einen Schraubverschluß an der Glassäule angebracht ist.

Die Tropfgeschwindigkeit beträgt 1-3 ml/min.

Die erhaltenen Fraktionen wurden dünnenschichtchromatographisch untersucht und entsprechend vereinigt.

II.4.2. Adsorbens:

Kieselgel 60, Korngröße $< 0,063$ mm (feiner als 230 mesh ASTM), Fa. Merck; Darmstadt.

II.4.3. Elutionsmittel:

Die zur Reinigung synthetischer Thiosulfinate verwendeten Elutionsmittel werden dort angegeben.

II.5. Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) mit Glassäulen

II.5.1. Apparative Daten:

Pumpe: Gilson Modell 303 mit Manometer Modell 802, Fa. Gilson, Villiers le Bel (Frankreich);

Säulen: 460 mm lange Glassäulen mit 26 mm i.D. (Säule 1) und 49 mm i.D. (Säule 2), mit Vorsäule, Fa. Büchi, Göppingen.

II.5.2. Pack- und Verfahrenstechnik:

Die Säulen werden ebenso wie eine darauf angebrachte Füllsäule mit trockenem Adsorbens gefüllt. Danach wird das Säulenmaterial durch Anlegen von 10 bar Stickstoffdruck komprimiert und die Füllsäule entfernt.

Anschließend wird die gepackte Säule mit dem gewünschten Elutionsmittel äquilibriert und das gelöste Substanzgemisch mit Hilfe einer 5 ml Einspritzschleife und eines 6-Wegehahns aufgetragen. Die Aufarbeitung der eluierten Fraktionen erfolgte wie in II.4..

Nach Beendigung einer Trennung wird die Säule mit Methanol gespült. Sie kann dann für den nächsten Lauf äquilibriert werden.

Flußrate: 10 ml/min

Gegendruck: 10-30 bar

Fraktionen zu 20 ml

II.5.3. Adsorbentien:

- Kieselgel 60, Korngröße < 0,063 mm (feiner als 230 mesh ASTM), Fa. Merck, Darmstadt
- Reversed phase-C₈-Material
Polygosil 60-2540 C₈, Korngröße 25-40 µm,
Fa. Machery & Nagel, Düren

II.5.4. Elutionsmittel:

Die verwendeten Fließmittelsysteme sind bei den entsprechenden Fraktionen und Substanzen bzw. in Abbildung 4, Seite 17 angegeben.

III. Spektroskopische und physikalische Methoden:

III.1. Schmelzpunkt:

Kofler-Heizbank der Fa. Reichert, Wien.
Der Schmelzpunkt ist unkorrigiert.

III.2. UV-Spektren:

Photodiodenarraydetektor HP 1040 A. Die UV-Spektren wurden während der HPLC-Trennung on-line aufgenommen.

III.3. Massenspektren:

- EI-MS: Massenspektrometer MS 80 RFA, Fa. Kratos (Manchester UK)
Ionenquelle: 200°C
Vakuum: 10⁻⁶ Torr
Beschleunigungsspannung: 4 KV
Filament Emission: 70 eV/50 µm
Auflösung: 1000, 3s/dec, 1s/int
Direkteinlaß ohne Erhitzen

- CI-MS: Massenspektrometer MS 80 RFA, Fa. Kratos,
 Reaktandgas: Ammoniak
 Ionenquelle: 200°C
 Vakuum: 5×10^{-5} Torr
 Beschleunigungsspannung: 4 KV
 Filament Emission: 120 eV/250 μ m
 Auflösung: 1000, 3s/dec, 1s/int
 Direkteinlaß ohne Erhitzen
- Beide Ionisierungsmethoden können alternierend angewendet werden.

III.4. ^1H -NMR-Spektren:

Die ^1H -NMR-Spektren wurden in CDCl_3 mit TMS als internem Standard aufgenommen.

- Kernresonanzspektrometer WP-80 (80,13 MHz),
 Fa. Bruker
- Kernresonanzspektrometer AM-250* (250,13 MHz),
 Fa. Bruker
- Kernresonanzspektrometer AM-300** (300,20 MHz),
 Fa. Bruker
- Kernresonanzspektrometer AM-360 (360,13 MHz),
 Fa. Bruker
- Kernresonanzspektrometer WM-400** (400,13 MHz),
 Fa. Bruker
- Kernresonanzspektrometer AM-500*** (500,14 MHz),
 Fa. Bruker

*Wie danken Herrn Dr. A. Neszmelyi, Ungarische Akademie der Wissenschaften, Budapest, für die NMR-Analysen der Verbindungen 3 und 4.

**Wir danken Herrn Dr. V. Wray, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, für die Aufnahme der 300 und 400 MHz-Spektren

***Wir danken Herrn Prof. Dr. Sonnenbichler, Max Planck Institut Martinsried, für die Aufnahme zweier 500 MHz Spektren

III.5. ^{13}C -NMR-Spektren:

Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden in CDCl_3 mit dem Lösungsmittel als internem Standard aufgenommen.

- Kernresonanzspektrometer WP-80 (20,15 MHz), Fa. Bruker
- Kernresonanzspektrometer AM-360 (90,56 MHz), Fa. Bruker

IV. Spezielle Arbeitsmethoden

IV.1. Extraktbereitung:

IV.1.1. Wasserdampfdestillat:

Jeweils 300 g frische, geschälte und gehackte Zwiebeln wurden mit Wasserdampf destilliert, das Destillat 2x mit Dichlormethan ausgeschüttelt, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abdestilliert. Bezogen auf das Frischgewicht der eingesetzten Droge wurde 0,013% Destillat erhalten.

IV.1.2. Ether-Perkolat aus lyophilisiertem Zwiebelgewebe:

Geschälte Zwiebeln wurden fein zerschnitten, lyophilisiert und das gefriergetrocknete Gewebe gemahlen. Das Lyophilisat wurde in Diethylether aufgeschlämmt, über Nacht mazeriert und danach in eine Glassäule ($h=45$ cm, i.D.=6,5 cm, $V=1500$ ml) überführt. Anschließend wurde mit Ether eluiert, bis das 3-fache Säulenvolumen an Extrakt abgetropft war. Nach der Aufarbeitung verblieb 0,020% Perkolat.

IV.1.3. Ether-Perforat aus Zwiebelpreßsaft:

Geschälte Zwiebeln wurden gegebenenfalls unter Zusatz einer geringen Menge Aqua dem. homogenisiert und das Homogenat nach ca. 30 min durch Auspressen entsaftet. Jeweils 1 l Preßsaft wurde 15 h im Perforator mit Diethylether extrahiert, wobei stündlich Austausch des

Extraktionsmittels erfolgte. Nach Vereinigung und Trocknen der organischen Phasen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Bezogen auf die eingesetzte Menge Frischdroge verblieben 0,064% Perforat.

IV.1.4. Chloroformausschüttelung aus Zwiebelpreßsaft:

Je 800 ml Zwiebelpreßsaft (s. IV.1.3.) wurden zweimal mit je 800 ml Chloroform ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung war Zentrifugation erforderlich. Nach Trocknen der organischen Phasen und Entfernung des Lösungsmittels wurden 0,026% Extrakt erhalten (bezogen auf die Frischdroge).

IV.2. Extraktfraktionierung und Isolierungen:

IV.2.1. Grobfraktionierung mittels Chromatotron:

Dicke der Kieselgelschicht: 2 mm

Auftragemenge: 300 mg

Eluens: Chloroform

Fraktionen: I (13%); II (34%)

Eluens: Chloroform/Methanol (100:10)

Fraktion III (36%)

Eluens: Methanol

Fraktion IV (12%)

IV.2.2. Abtrennung der Triterpene durch Flash-Chromatographie:

- Adsorbens: RP₈-Material

Polygosil 60-2540 C₈, mittlere Korngröße 25-40 µm,
Fa. Machery & Nagel, Düren

- Säule: i.D. 1,3 cm; Gelbetthöhe 10 cm;

- Eluens: Methanol

- Fraktionen zu 2 ml

- Die Triterpene wurden in den Fraktionen 11-16 eluiert, die übrigen Extraktkomponenten in den Fraktionen 6-10

IV.2.3. Fraktionierung des Extraktes mit MPLC:

- Adsorbens: Kieselgel (s. II.5.3.)
- Säule 2 (s.II.5.1.)
- Eluens: Toluol/Ethylacetat (10:2)
- Fraktionen zu 20 ml
- Auftragemenge: 2g sterolfreier Extrakt
- Eluiert wurden 110 mg (5,5%) Frkt. II/0, 93 mg (4,6%) Frkt. II/1, 40 mg (2,0%) Frkt. II/2, 110 mg (5,5%) Frkt. II/3 und 85 mg (4,3%) Frkt. II/4.

IV.2.4. Isolierung der Substanzen 3 und 4:

- Adsorbens: Kieselgel (s. II.5.3.)
- Säule 1 (s.II.5.1.)
- Eluens: Dichlormethan/Aceton (100:1) für 3
n-Pentan/Aceton (100:5) für 4
- Fraktionen zu 20 ml
- Auftragemenge: ca. 50 mg der Fraktionen II/3 (Substanz 3) oder II/2 (Substanz 4) aus IV.2.3.
- Eluiert wurden 30 mg 3 bzw. 18 mg 4

IV.2.5. Trennung der Substanzen 1 und 2:

- Adsorbens, Säule, Fraktionen wie in IV.2.4.
- Eluens: Dichlormethan/Diethylether/Aceton (100:2:1)
- Auftragemenge: ca. 40 mg der Mischung 1+2 (s. IV.2.4.)
- Eluiert wurden 10 mg 1 und 12 mg 2

IV.2.6. Isolierung der Substanz 7:

- Adsorbens, Säule, Fraktionen wie in IV.2.4.
- Eluens: Chloroform/Aceton (100:2)
- Auftragemenge: 50 mg 5+6+7
- Eluiert wurden 8 mg 7 und 25 mg 5+6

IV.2.7. Trennung der Substanzen 5 und 6:

- Adsorbens, Säule, Fraktionen wie in IV.2.4.
- Eluens: Dichlormethan/Aceton (100:0,5)
- Auftragemenge: 25 mg 5+6
- Eluiert wurden in den Fraktionen 33-36 4 mg 6 und

in den Fraktionen 39-43 5 mg 5.

IV.2.8. Isolierung von 4/1 bis 4/4:

- Adsorbens, Säule und Fraktionen wie in IV.2.3.
- Eluens: n-Hexan/Ethylacetat (10:3)
- Auftragemenge: 250 mg Fraktion II/4 (s. IV.2.3.)
- Eluiert wurden nach 2500 ml Vorlauf in den Frkt. 85-95 11 mg 4/1, in den Frkt. 100-120 32 mg 4/2, in den Frkt. 130-139 15 mg 4/3 und in den Frkt. 150-160 20 mg 4/4.

IV.2.9. Endreinigung isolierter Substanzen vor der spektroskopischen Untersuchung durch Flash-Chromatographie:

- Säule: i.D.=8 mm, Gelbetthöhe=10 cm
- Adsorbens: Kieselgel (s. II.5.3.)
- Elutionsmittel: Dichlormethan/Aceton (100:2-4)

IV.3. Synthesen

IV.3.1. Herkunft der Reagentien:

Dimethyldisulfid, Dipropyldisulfid, Diallyldisulfid, Diphenyldisulfid, Propanthiol, Thiophenol und 3-Chlorperbenzoesäure wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

IV.3.2. Arbeitsweise

IV.3.2.1. Symmetrisch substituierte Thiosulfinsäureester:

0,05 mol eines Disulfides wurden in 300 ml Dichlormethan gelöst und die Lösung im Eisbad gekühlt. Mit Hilfe eines Scheidetrichters wurden 0,045 mol 3-Chlorperbenzoesäure gelöst in 75 ml Dichlormethan unter Rühren langsam zugetropft. Danach wurde weitere 15 min gerührt und der Niederschlag abfiltriert. Nach dem Waschen mit je 300 ml 5%-iger NaHCO_3 -Lösung, 3%-iger NaHCO_3 -Lösung und Aqua dem. wurde die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das

Lösungsmittel unter vermindertem Druck abgezogen. Die Reinigung der Produkte von Nebenprodukten und nicht umgesetzten Disulfiden wird unter IV.3.2.3. beschrieben.

IV.3.2.2. Asymmetrisch substituierte Thiosulfinsäureester:

0,2 mol Thiophenol bzw. Propanthiol wurden zusammen mit 0,2 mol Dimethyldisulfid unter Zusatz von 80 ml 1%-iger methanolischer KOH und 10 ml Wasser in 500 ml Methanol gelöst.

Der Reaktionsansatz wurde 3 h im Abzug! unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, bis die HPLC-Untersuchung die Abwesenheit von Dimethyldisulfid anzeigte (HPLC System 5).

Anschließend wurde die methanolische Lösung mit 300 ml Wasser versetzt und 3x mit 500 ml n-Pentan ausgeschüttelt. Die Pentanphase wurde getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert.

Die erhaltenen Disulfide wurden dann wie unter IV.3.2.1. oxidiert und der Ansatz entsprechend aufgearbeitet.

IV.3.2.3. Reinigung der Produkte:

- Die Reinigung von Nebenprodukten und nicht umgesetzten Disulfiden erfolgte mittels Chromatron oder Flash-Chromatographie an Kieselgel: Dabei wird zunächst nicht umgesetztes Disulfid mit n-Hexan eluiert, danach Thiosulfonat und Thiosulfinat mit Dichlormethan/n-Hexan (1:1) [Diphenylthiosulfinat], Dichlormethan:Aceton (100:1) [Dipropylthiosulfinat und Diallylthiosulfinat] oder Dichlormethan:Aceton (100:2) [Dimethylthiosulfinat] getrennt.

Bei Verwendung des Fliehkraftchromatographiesystems ist die Fraktionierung erleichtert, da im UV-254 die Wanderung der fluoreszenzmindernden Thiosulfinate verfolgt werden kann. Die Flash-Chromatographie erlaubt höhere Auftragemengen.

- Trennung von Dipropylthiosulfinat und Methylpropyl-/Propylmethylthiosulfinat:
MPLC (Säule, Adsorbens und Fraktionen s. IV.2.4.)
Eluens: n-Hexan/Ethylacetat (10:2)
Auftragmenge: 1,3 g Reaktionsansatz
Eluiert: Frkt. 28-43 380 mg Dipropylthiosulfinat,
Frkt. 58-95 480 mg Methylpropyl-/Propylmethylthio-
sulfinat

- Reindarstellung von Phenylmethylthiosulfinat und
Methylphenylthiosulfinat
MPLC (Säule, Adsorbens und Fraktionen s. IV.2.3.)
Eluens: Dichlormethan
Auftragmenge: 3 g Reaktionsansatz
Eluiert: Nach 450 ml Vorlauf in Fraktion 1-20
Disulfide, in Fraktion 65-100 ca. 0,7g Diphenyl-
thiosulfinat, in Fraktion 170-205 ca. 0,2g Phenyl-
methylthiosulfinat und in Fraktion 240-280 ca. 0,8g
Methylphenylthiosulfinat

IV.4. Gehaltsbestimmungen:

Von Dimethylthiosulfinat und der Mischung aus Methylpropyl- und Propylmethylthiosulfinat wurden Lösungen der Konzentration 1 mg/ml in Methanol hergestellt. 1 µl dieser Lösungen enthielt 1 µg Thiosulfinat. Durch HPLC-Chromatographie von 0,5-6,0 µl dieser Lösungen wurden die den Substanzmengen entsprechenden Peakflächen ermittelt. Die Abhängigkeit der Peakfläche von der Substanzmenge war im oben genannten Bereich linear. Aus den ermittelten Eichgeraden war zu entnehmen, daß 5 µg Dimethylthiosulfinat einer Peakfläche von 12×10^6 Einheiten entsprechen. 5 µg der Mischung aus Methylpropyl- und Propyl-methylthiosulfinat entsprechen einer Peakfläche von $20,9 \times 10^6$ Einheiten.

IV.5. Stabilitätsuntersuchungen:

Eine Stammlösung des Extraktes (50 mg/ml) in MeOH wurde nach 24-stündiger Lagerung bei -20°C in der Kälte zentrifugiert, um die größtenteils ausgefallenen Triterpene zu entfernen. Die Stammlösung wurde 1:5 verdünnt (Untersuchungslösung).

IV.5.1. Langzeitlagerungsversuch:

Jeweils 2 ml der Untersuchungslösung wurden in dicht verschlossenen Zentrifugenschliffgläsern bei RT, +4°C, -20°C und -70°C gelagert.

IV.5.2. Streßtests:

Die Streßtests wurden in dicht verschlossenen HPLC-Probengefäßen mit Schraubdeckel, Fa. Waters, Eschborn, durchgeführt.

Bei Untersuchungen mit ungelöstem Extrakt wurde eine definierte Menge Untersuchungslösung (s.IV.4.) in das Probengefäß pipettiert und das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen. Nach dem Erhitzen wurde der Extrakt wieder zu 10 mg/ml in Methanol aufgenommen und mit HPLC untersucht.

Bei den Untersuchungen mit ethanolischer Extraktlösung wurde wie oben der Methanol abgeblasen und der Extrakt in derselben Menge Ethanol aufgenommen. Die ethanolische Lösung diente als Untersuchungslösung.

IV.5.3. Auswertung:

Die Untersuchungslösung wurde im HPLC-System 1 chromatographiert.

Alle Gehaltsangaben der bestimmten Substanzen sind Mittelwerte aus 2 Einspritzungen einer Probe und sind auf den Gehalt der Untersuchungslösung bezogen.

V. Physikalische Daten

V.1. Isolierte Substanzen

V.1.1. Verbindung 1: Methylthiosulfinsäure-S-trans-1-propenylester

SF: $C_4H_8OS_2$ MG: 136,227 ölig
Rt: 4,1 min (HPLC-System 1)
UV: max = 215 (sh), 250 nm (Diodenarray)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 290 (7) $[2M+NH_4]^+$, 273
(22) $[2M+H]^+$, 156 (5), 154 (65) $[M+NH_4]^+$, 139
(8), 137 (100) $[M+H]^+$, 120 (5), 90 (6), 73(7)

1H -NMR: s. Tabelle 1 S. 28

^{13}C -NMR: s. Tabelle 2 S. 32

V.1.2. Verbindung 2: Methylthiosulfinsäure-S-cis-1-propenylester

SF: $C_4H_8OS_2$ MG: 136,227 ölig
Rt: 4,3 min (HPLC-System 1)
UV: max = 215 (sh), 250 nm (Diodenarray)

CI-MS: wie Verbindung 1

1H -NMR: s. Tabelle 1 S. 28

^{13}C -NMR: s. Tabelle 2 S. 32

V.1.3. Verbindung 3: cis-3,4-Dimethyl-7-oxa-2,5-dithia bicyclo [4.1.0.] heptan

SF: $C_6H_{10}OS_2$ MG: 162,264 ölig
Rt: 6,3 min (HPLC-System 1)
UV: max = 230, 250 nm (Diodenarray)
EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 113 (100), 99 (80)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 180 (21) $[M+NH_4]^+$, 165
(5), 163 (65) $[M+H]^+$, 145 (55), 113 (62), 35
(100)

$^1\text{H-NMR}$: s. Tabelle 6 S. 45

$^{13}\text{C-NMR}$: s. Tabelle 6 S. 45

Elementaranalyse:

gef.: C: 44,5%, H: 6,1%, O: 9,3%, S: 38,2%

ber.: C: 44,4%, H: 6,2%, O: 9,9%, S: 39,5%

V.1.4. Verbindung 4: trans-3,4-Dimethyl-7-oxa-2,5-dithia
bicyclo [4.1.0.] heptan

SF: $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{OS}_2$ MG: 162,264 ölig

Rt: 6,6 min (HPLC-System 1)

UV: max = 230, 250 nm (Diodenarray)

EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 163 (41), 162 (22), 113
(98), 99 (100)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 180 (10) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 165
(8), 163 (100) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 145 (13), 99 (7), 35
(53)

$^1\text{H-NMR}$: s. Tabelle 6 S. 45

$^{13}\text{C-NMR}$: s. Tabelle 6 S. 45

V.1.5. Verbindung 5: n-Propylthiosulfinsäure-S-cis-1-
propenylester

SF: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{OS}_2$ MG: 164,280 ölig

Rt: 9,7 min (HPLC-System 1)

UV: max = 215 (sh), 250 nm (Diodenarray)

EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 164 $[\text{M}]^+$, 148, 122, 106,
92, 73

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 182 (30) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 167
(7), 165 (82) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 35 (100)

$^1\text{H-NMR}$: s. Tabelle 4 S. 38

$^{13}\text{C-NMR}$: s. Tabelle 5 S. 38

V.1.6. Verbindung 6: n-Propylthiosulfinsäure-S-trans-1-propenylester

SF: $C_6H_{12}OS_2$ MG: 164,280 ölig
Rt: 9,9 min (HPLC-System 1)
UV: max = 215 (sh), 250 nm (Diodenarray)
EI-MS: wie Verbindung 5

CI-MS: wie Verbindung 6

1H -NMR: s. Tabelle 4 S. 38

^{13}C -NMR: s. Tabelle 5 S. 38

V.1.7. Verbindung 7: n-Propylthiosulfinsäure-S-n-propylester

SF: $C_6H_{14}OS_2$ MG: 166,296 ölig
Rt: 9,9 min (HPLC-System 1)
UV: max = 240 nm (Diodenarray)
EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 166 (66) M^+ , 150 (25),
124 (60), 108 (30), 106 (40), 92 (40), 82
(50), 75 (65), 59 (85), 43 (100)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 184 (25) $[M+NH_4]^+$, 169
(8), 167 (100) $[M+H]^+$, 35 (32)

1H -NMR: s. Tabelle 3 S. 35

^{13}C -NMR: s. Tabelle 3 S. 35

V.1.8. Verbindung 4/1: trans-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2-decen-4-S-oxid

SF: $C_9H_{18}OS_3$ MG: 238,421 ölig
Rt: 16,8 min (HPLC-System 1)
UV: max = 240 nm (sh) (Diodenarray)
EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 149 (90), 107 (25), 90
(20), 73 (100), 43 (70)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 256 (7) $[M+NH_4]^+$, 241
(12), 239 (100) $[M+H]^+$, 182 (15), 165 (30),
151 (8), 149 (95), 131 (11), 73 (25), 58
(15), 35 (80)

¹H-NMR: 360 MHz: δ (ppm) = 1,01 (t; 7,2 Hz; 3H), 1,17 (t; 7,2 Hz; 3H), 1,42 (d,d,q; 14,4/10,8/7,2 Hz; 1H), 1,73 ("sextett"; 7,2 Hz; 2H), 1,97 (d,d; 6,3/1,35 Hz; 3H), 2,20 (d,d,q; 14,4/3,6/7,2 Hz; 1H), 2,78 (t; 7,0 Hz; 2H), 3,68 (d,d; 10,8/3,6 Hz; 1H), 6,33 (q,d; 1,35/14,9 Hz; 1H), 6,51 (q,d; 6,8/14,9 Hz; 1H);
Zuordnung s. Tab. 8 S. 75;

V.1.9. Verbindung 4/2 A: trans,trans-5-Ethyl-4,6,7-trithia-2,8-decadien-4-S-oxid

SF: C₉H₁₆OS₃ MG: 236,405 ölig
Rt: 15,8 min (HPLC-System 1)
UV: λ_{max} = 230 nm (sh) (Diodenarray)
EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 147 (68), 105 (65), 83 (85), 43 (100)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 473 (30) [2M+H]⁺, 239 (12), 237 (95) [M+H]⁺, 180 (65), 162 (80), 147 (100), 105 (35), 73 (30), 35 (25)

¹H-NMR: 400 MHz: δ (ppm) = 1,149 (t; 7,3Hz; 3H), 1,45 (d,d,q; 10,9/?/7,3 Hz; 1H), 1,81 (d,d; 6,3/1,1 Hz; 3H), 1,960 (d,d; 6,8/1,5 Hz; 3H), 2,21 (d,d,q; 3,5/?/7,3 Hz; 1H), 3,686 (d,d; 10,9/3,5 Hz; 1H), 6,04 (d,q; 14,5/6,3 Hz; 1H), 6,122 (q,d; 1,1/14,5 Hz; 1H), 6,318 (q,d; 1,2/15,1 Hz; 1H), 6,509 (q,d; 6,8/15,1 Hz; 1H);
Zuordnung s. Tab. 8 S. 75;

V.1.10. Verbindung 4/2 B: trans,cis-5-Ethyl-4,6,7-trithia-
2,8-decadien-4-S-oxid

$^1\text{H-NMR}$: 400 MHz: δ (ppm) = 1,159 (t; 7,3 Hz; 3H), 1,45 (d,d,q; 10,9/?/7,3 Hz; 1H), 1,79 (d,d; 6,8/1,6 Hz; 3H), 1,963 (d,d; 6,8/1,1 Hz; 3H), 2,21 (d,d,q; 3,4/?/7,3 Hz; 1H), 3,680 (d,d; 10,9/3,4 Hz; 1H), 5,82 (d,q; 9,2/6,9 Hz; 1H), 6,122 (q,d; 1,6/9,2 Hz; 1H), 6,318 (q,d; 1,2/15,1 Hz; 1H), 6,517 (q,d; 6,8/15,1 Hz; 1H);
Zuordnung s. Tab. 8 S.75;

Alle anderen Daten s. 4/2 A

V.1.11. Verbindung 4/3: Diastereomer zu 4/1

SF: $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{OS}_3$ MG: 238,421 ölig
Rt: 16,8 min (HPLC-System 1)
UV: λ_{max} = 240 nm (sh) (Diodenarray)
EI-MS: wie 4/1

CI-MS: wie 4/1

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz: δ (ppm) = 1,00 (t; 7,3 Hz; 3H), 1,14 (t; 7,3 Hz; 3H), 1,71 ("sextett"; 7,3 Hz; 2H), 1,89 (d,d,q; ?/10,5/7,3 Hz; 1H), 1,97 (d,d; 6,2/0,9 Hz; 3H), 2,27 (d,d,q; 3,5/?/7,3 Hz; 1H), 2,73 (t; 7,3 Hz; 2H), 3,48 (d,d; 10,5/3,5 Hz; 1H), 6,44 (q,d; 0,9/15,1 Hz; 1H), 6,55 (q,d; 6,3/15,1 Hz; 1H),
Zuordnung s. Tab. 8 S. 75;

V.1.12. Verbindung 4/4 A: Diastereomer zu 4/2 A

SF: C₉H₁₆OS₃ MG: 236,405 ölig

Rt: 15,8 min (HPLC-System 1)

UV: $\lambda_{\max}$ = 230 nm (sh) (Diodenarray)

EI-MS: wie 4/2 A

CI-MS: wie 4/2 A

¹H-NMR: 300 MHz: δ (ppm) = 1,13 (t; 7,3Hz; 3H), 1,791 (d,d; 6,1/0,9 Hz; 3H), 1,90 (d,d,q; 10,9/10,6/7,3 Hz; 1H), 1,96 (d,d; 6,2/1,0 Hz; 3H), 2,26 (d,d,q; 10,9/3,5/7,3 Hz; 1H), 3,52 (d,d; 10,6/3,5 Hz; 1H), 6,02-6,07 (sec. order; 2H), 6,44 (q,d; 1,1/15,1 Hz; 1H), 6,56 (q,d; 6,3/15,1 Hz; 1H);
Zuordnung s. Tab. 8 S. 75;

V.1.13. Verbindung 4/4 B: Diastereomer zu 4/2 B

¹H-NMR: 300 MHz: δ (ppm) = 1,14 (t; 7,3Hz; 3H), 1,794 (d,d; 6,9/1,6 Hz; 3H), 1,90 (d,d,q; 10,9/10,6/7,3 Hz; 1H), 1,96 (d,d; 6,2/1,0 Hz; 3H), 2,28 (d,d,q; 10,9/3,5/7,3 Hz; 1H), 3,50 (d,d; 10,7/3,5 Hz; 1H), 5,79 (q,d; 6,9/9,2 Hz; 1H), 6,11 (q,d; 1,5/9,2 Hz; 1H), 6,46 (q,d; 1,1/15,1 Hz; 1H), 6,57 (q,d; 6,2/15,1 Hz; 1H);
Zuordnung s. Tab. 8 S.75;

Alle anderen Daten s. 4/4 A

V.2. Synthetische Substanzen

V.2.1. Dimethylthiosulfinat:

SF: $C_2H_6OS_2$ MG: 110,189 ölig

Rt: 1,7 min (HPLC-System 1)

UV: $\lambda_{max} = 240$ nm (Diodenarray)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 130 (8), 128 (100)
[$M+NH_4$]⁺

¹H-NMR: 80 MHz: δ (ppm) = 2,67 (s, 3H), 3,00 (s, 3H)

V.2.2. Dipropylthiosulfinat:

siehe Verbindung 7

V.2.3. Methylpropyl-, Propylmethylthiosulfinat (Isomerengemisch):

SF: $C_4H_{10}OS_2$ MG: 138,242 ölig

Rt: 4,3/4,5 min (HPLC-System 1)

UV: $\lambda_{max} = 240$ nm (Diodenarray)

EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 138 (35) M⁺, 96 (70), 75 (55), 47 (75), 45 (90), 43 (90), 41 (100), 32 (70)

CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 156 (25) [$M+NH_4$]⁺, 141 (8), 139 (95) [$M+H$]⁺, 43 (5), 35 (100)

¹H-NMR: 80 MHz: δ (ppm) = 1,10 (t, 3H), 1,12 (t, 3H), 1,87 (m, 2x2H), 2,70 (s, 3H, $\underline{CH}_3$ -S-S(O)-R), 3,00 (s, 3H, $\underline{CH}_3$ -S(O)-S-R), 3,12 (m, 2x2H)

V.2.4. Diallylthiosulfinat

SF: $C_6H_{10}OS_2$ MG: 162,264 ölig

Rt: 12,3 min (HPLC-System 1)

UV: $\lambda_{max} = 260$ nm (Diodenarray)

EI-CI-MS: Wegen der Instabilität der Substanz wurden keine charakteristischen Massenfragmente aufgefunden

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz: δ (ppm) = 3,57 (d, 7,4 Hz, 2H), 3,88 (d, 7,5 Hz, 2H), 5,24 (m, 2H), 5,45 (m, 1H), 5,47 (m, 1H), 5,85 (m 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$: 43,83; 60,18; 120,14; 124,38; 125,45; 132,02

V.2.5. Methylphenylthiosulfinat:

SF: $\text{C}_7\text{H}_8\text{OS}_2$ MG: 172,260 ölig
Rt: 7,8 min (HPLC-System 1)
UV: λ_{max} = 223 (sh), 250 nm (Diodenarray)
EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 172 (75) M^+ , 156 (25), 141 (30), 125 (60), 84(45), 77 (60), 69 (70), 63 (100)
 $^1\text{H-NMR}$: 80 MHz: δ (ppm) = 3,00 (s, 3H), 7,25-7,75 (m, 5H)

V.2.6. Phenylmethylthiosulfinat:

SF: $\text{C}_7\text{H}_8\text{OS}_2$ MG: 172,260 ölig
Rt: 9,2 min (HPLC-System 1)
UV: λ_{max} = 220 (sh), 260 (Diodenarray)
EI-MS: m/z (rel. Int. %) = 172 (10) M^+ , 156 (45), 141 (30), 125 (100), 97 (70), 77 (100)
 $^1\text{H-NMR}$: 80 MHz: δ (ppm) = 2,60 (s, 3H), 7,30-7,80 (m, 5H)

V.2.7. Diphenylthiosulfinat:

SF: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{OS}_2$ MG: 234,330 Smp.: 62-63°C
Rt: 18,4 min (HPLC-System 1)
UV: λ_{max} = 222, 283 nm (Diodenarray)
CI-MS: m/z (rel. Int. %) = 252 (30) $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, 237 (8), 235 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$
 $^1\text{H-NMR}$: 80 MHz: δ (ppm) = 7,25-7,80 (m)

VI. Pharmakologische Methoden

VI.1. Pharmakologische Untersuchungen in vitro:

VI.1.1. Prüfung auf Beeinflussung der Histaminfreisetzung aus humanen peripheren Leukozyten:*

Aus dem venösen Blut atopischer Spender werden periphere Leukozyten durch Dextransedimentation isoliert. Die Testsubstanzen werden in Ethanol gelöst. Die Leukozyten werden mit Testsubstanz oder der entsprechenden Konzentrationen Lösungsmittel (Kontrolle) für 10 min vorinkubiert. Danach wird durch Zugabe von 2 IU Kaninchen- α -IgE-Antikörpern (Behringwerke, Marburg) Histaminfreisetzung ausgelöst. In einer Kontrollmessung wird durch Zusatz von physiol. Kochsalzlsg. statt der α -IgE-Antikörper evtl. Histaminfreisetzung durch die Testsubstanz bestimmt. Das Histamin im Überstand wird spektrofluorometrisch nach Umsetzung mit o-Phthaldialdehyd bestimmt. Die Histaminfreisetzungsrates wird nach Abzug der spontanen Freisetzung (<5%) auf die Maximalfreisetzung (=100%) nach Zellzerstörung mit Perchlorsäure bezogen.

VI.1.2. Prüfung auf Beeinflussung der Thromboxan B₂-Biosynthese im plättchenreichen Plasma (PRP):**

Citratplasma atopischer Spender wird in K₂HPO₄-Puffer auf 90 000 Blutplättchen/ml eingestellt. 1 ml plättchenreiches Plasma (PRP) wird 3 min lang mit der in 1%-DMSO gelösten Testsubstanz oder Lösungsmittel vorinku-

*Der Histamin-Release-Test wurde in der Dermatologischen Klinik der Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. J. Ring durchgeführt.

**Die Testungen wurden im Arbeitskreis von PD Dr. med. habil. W. Dorsch, Pädiatrische Abteilung der Poliklinik der Universität München durchgeführt.

biert. Die Stimulierung erfolgt mit 1 oder 10 IU Thrombin (Behringwerke, Marburg). Nach 15 min wird die Reaktion durch Zugabe von eiskaltem Methanol gestoppt und das Thromboxan B₂ im Überstand durch RIA gemessen. Die erhaltenen Werte werden um die Wiederfindungsraten (80-100%) korrigiert.

VI.1.3. Prüfung auf Beeinflussung der Cyclooxygenaseaktivität:

Mikrosomen aus Schafsamenblasen werden nach Nugteren und Hazelhof isoliert. Von der Enzympräparation, die 35% Protein enthält, werden 2 mg je Testansatz eingesetzt. Die Inkubation erfolgt in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (Endvolumen 2 ml). Weiterhin enthält der Ansatz 1 mM reduziertes Glutathion (Fa. Merck, Darmstadt), 1 mM Adrenalinbitartrat (Fa. Caesar & Lorenz, Hilden) und 0,05 mM EDTA. Die Testsubstanzen werden in ethanolischer Lösung zugesetzt und der Ansatz bei 23°C für 5 min vorinkubiert. Die Kontrollen enthalten eine entsprechende Menge Ethanol. Zugabe von 0,1 µCi [1-¹⁴C]-Arachidonsäure (Fa. New England Nuclear, Dreieich) startet die Reaktion. Anschließend wird 20 min lang bei 23°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Eiskühlung und Zusatz von Ameisensäure gestoppt und das Inkubat mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingengt und der Rückstand zur HPLC-Analyse (HPLC-System 6) in Ethanol aufgenommen. Die Hemmwerte beziehen sich auf die im Vergleich zu den Kontrollen verminderte Konzentration an PGE₂.

VI.1.4. Prüfung auf Beeinflussung der 5-Lipoxygenaseaktivität:

Aus frischem Schweineblut werden durch Dextransedimentation Leukozyten isoliert.

2,5 ml Leukozytensuspension (15×10^6 Zellen/ml Na_2PO_4 -Puffer pH 7,4) werden mit 2 mM CaCl_2 , 10 μM ETYA (Fa. Hoffmann La Roche; Grenzach-Wylen), 15 μM Ionophor A 23187 (Fa. Boehringer, Mannheim), $[1-^{14}\text{C}]$ -Arachidonsäure (Fa. New England Nuclear, Dreieich) und der in Ethanol gelösten Testsubstanz 5 min bei 37°C inkubiert. Die Kontrollen enthalten eine entsprechende Menge Ethanol. Aufarbeitung des Ansatzes, Trennung und quantitative Bestimmung der Arachidonsäure und ihrer Metabolite erfolgt in gleicher Weise wie beim Cyclooxygenasehemmtest (HPLC-System 7).

Die Hemmwerte beziehen sich auf die im Vergleich zu den Kontrollen verminderte Konzentration von 5-HETE.

VI.1.5. Prüfung auf Beeinflussung der PAF-induzierten Chemo-lumineszenz humaner neutrophiler Granulozyten (PMNL):

Geräte: Biolumat LB 9505, Fa. Beckmann (USA) mit Apple II e-Computer. Meß- und Auswerteprogramm Fa. Berthold, Wildbad.

Herkunft der Reagentien:

- PAF C16-Racemat, Fa. Nattermann, Köln wurde von Dr. W. Dorsch, Pädiatrische Klinik der Universität München zur Verfügung gestellt.
- Luminol: Fa. Boehringer, Mannheim
- Cytochalasin B: Fa. Sigma, Taufkirchen

Lösungen:

- Veronalpuffer pH 7
- Luminollsg.: 1,75 mg in 1 ml DMSO. Diese Stammlsg. wird 1:50 verdünnt (=0,2 mM).
- Cytochalasin B-Lösung: Stammlsg.: 1mg/ml Ethanol. Die Stammlsg. wird mit Veronalpuffer 1:50 verdünnt (20 µg/ml)
- PAF-Lösung: 1mg PAF C16-Racemat wird in 100µl Ethanol gelöst. Nach Zusatz von 3,9 ml physiol. NaCl-Lsg, die zur Stabilisierung 2,5 mg/ml BSA enthält, wird 1:10 mit Veronalpuffer verdünnt (25µg/ml).

Humane PMNL werden durch Dextransedimentation und Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert, mit PBS gewaschen und in RPMI-Medium (Fa. Gibco, Europe) auf 300 Zellen/µl eingestellt. Die Testsubstanz wird in Ethanol gelöst. Die Kontrollen enthalten entsprechende Mengen Ethanol.

30000 Zellen werden mit 0,02 mM Luminol, 2 µg Cytochalasin B und Testsubstanz bei 37°C im Photomultiplier 5 min lang vorinkubiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 1000 µl. Die Reaktion wird durch Zugabe von 25 µg PAF gestartet und 10 min gemessen.

Zur Testauswertung wird die graphische Darstellung der Chemolumineszenz-Ausbeute (cpm) herangezogen. Die Maxima und die Integrale je dreier Verum- und Kontrollmessungen werden gemittelt und die Verminderung der Chemolumineszenz-Antwort in % angegeben.

VI.1.6. Prüfung auf Radikalfängereigenschaften:

Geräte: s. VI.1.5.

Herkunft der Reagentien:

- Purin: Fa. Sigma, Taufkirchen
- Xanthinoxidase, 0,42 Units/mg Protein: Fa. Sigma
- Luminol: s. VI.1.5.

Lösungen:

- 6 mg Purin/ml Veronalpuffer
- 0,42 Units/mg Protein werden 1:50 mit Veronalpuffer verdünnt
- Luminol s. VI.1.5.

Die Testsubstanz wird bei 26°C zusammen mit 0,6 mg Purin, 3,5 µg Luminol und Units Xanthinoxidase 20 min lang im Photomultiplier inkubiert und die Chemolumineszenz-Ausbeute gemessen.

Testauswertung wie in VI.1.5..

VI.2. **Pharmakologische Untersuchungen in vivo***

VI.2.1. Prüfung auf Beeinflussung der Allergen-induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen:

Männliche Meerschweinchen der Rasse "Pirbright white" (Fa. Ivanovas, Kießlegg) werden durch intraperitoneale und subcutane Injektion von je 100 mg Ovalbumin Grade II (Fa. Sigma, St.Louis, USA) gegen Ovalbumin sensibilisiert. 2-3 Wochen später wird nach Überprüfung der Sensibilität durch Inhalation des Allergens Asthma provoziert. Dazu wird eine 1%-ige Ovalbuminlösung 10-30 s durch Ultraschall in die Einatemluft des

*Die in vivo Untersuchungen wurden in der Pädiatrischen Abteilung der Poliklinik der Universität München unter der Leitung von PD. Dr. med. habil. W. Dorsch durchgeführt.

Versuchstieres vernebelt. 10 min später erfolgt eine weitere Provokation. 45 min vor der ersten Allergen-inhalation wird den Versuchstieren mit Hilfe einer Tuberkulinspritze peroral Testsubstanz im Träger (Verum) oder nur Träger (Kontrolle) verabreicht. Als Träger finden physiologische Kochsalzlösung für hydrophile und Olivenöl für lipophile Proben Verwendung.

Nach 30, 60, 90 s und danach in Abständen von 1 min werden die compressed-air-Werte mit einer Methode nach Waldherr [153] gemessen.

3-4 Tage später wird der Versuch unter Vertauschung von Verum- und Kontrollgruppe als Überkreuzprotokoll wiederholt.

VI.2.2. Prüfung auf Beeinflussung der PAF-induzierten bronchialen Obstruktion bei Meerschweinchen:

Der verwendete Testaufbau entspricht VI.2.1..

Abweichend von der ersten Versuchsanordnung werden die Versuchstiere nicht allergisiert. Sie inhalieren stattdessen 90-120 s lang eine PAF-Lösung der Konzentration 1 µg/ml. PAF C16-Racemat wurde von der Fa. Nattermann, Köln bezogen.

Abweichend von VI.2.1 wird die asthmatische Reaktion der Tiere nach 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 und 30 min gemessen.

E. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Dorsch, W., Adam, O., Weber, J., European Academy of Allergy and Applied Immunology, Abstract in: *FoL. allergol. immunol. clin.* 30 (suppl. to No. 4): 17 (1983)
2. Michahelles, E., Dissertation Universität München (1974)
3. Matikkala, E.J., Virtanen, A.I., *Acta Chem. Scand.* 21, 2891 (1969)
4. Schwimmer, S., Friedmann, M., *The Flavour Ind.* 3, 137 (1972)
5. Schwimmer, S., *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 312 (1969)
6. Stoll, A., Seebeck, E., *Adv. Enzymol.* 11, 377 (1951)
7. Freeman, G.G., Whenham, R.L.J., *J. Sci. Fd. Agric.* 26, 1869 (1975)
8. Boelens, M., de Valois, P.J., Wobben, H.J., van der Gen, A., *J. Agr. Fd. Chem.* 19, 984 (1971)
9. Freeman, G.G., Whenham, R.J., *Phytochem.* 15, 187 (1976)
10. Tokarska, B., Karwowska, K., *Nahrung* 26(6), 565 (1981)
11. Aksoy, H.A., *Z. Lebensm. Unter. Forsch.* 177, 34 (1983)
12. Fenwick, G.R., Hanley, A.B., *CRC Crit. Rev. Fd. Sci. Nutr.* 22, 273 (1985)
13. Hanley, A.B., Fenwick, G.R., *J. Plant Fd.* 6, 211 (1985)
14. Abraham, K.O., Shankaranarayana, M.L., Raghavan, B., Natarajan, C.P., *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* 9, 193 (1976)
15. Nakata, C., Nakata, T., Hishikawa, A., *Analyt. Biochem.* 37, 92 (1970)
16. Fujiwara, M., Yoshimura, M., Tsuno, S., *J. Biochem. (Japan)* 42, 591 (1955)
17. Virtanen, A., Matikkala, E.J., *Suomen Kemistilehti* 34, 114 (1961)
18. Brodnitz, M.H., Pascale, J.V., *J. Agr. Food Chem.* 19(2), 269 (1971)
19. Attrep, K.A., Bellman, W.P., Attrep, M., *Lipids* 15, 292 (1908)
20. Üstünes, L., Claeys, M., Laekeman, G., Herman, A.G., Vlietinck, A.J., Özer, A., *Prostaglandins* 29(5), 848 (1985)
21. Dinand, B., *Handbuch der Heilpflanzenkunde*, S.51, Eßlingen (1926)
22. *Flamm-Kroeber, Heilkraft der Pflanzen* 17, S.257, Stuttgart (1937)
23. Menon, I.S., Kendal, R.Y., Dewar, H.A., Newell, D.J., *Brit. med. J.* 3, 351 (1968)
24. Baghurst, K.I., Raj, M.J., Truswell, A.S., *Lancet* 1977, 101
25. Phillips, C., Poyser, N.L., *Lancet*, 1978, 1051
26. Weisenberger, H., Grube, H., Koenig, E., Pelzer, H., *Febs. Lett.* 26(1), 105 (1972)
27. Augusti, T., Benaim, M.E., Dewar, H.A., Virden, R., *Artherosclerosis* 21, 409 (1975)
28. Makheja, A.N., Vanderhoek, J.Y., Bailey, J.M., *Lancet* 1979, 781
29. Makheja, A.N., Vanderhoek, J.Y., Bailey, J.M., *Prostaglandins and Medicine* 2, 413 (1979)

30. Vanderhoek, J.Y., Mekheja, A.N., Bailey, J.M., *Biochem. Pharmacol.* 29, 3169 (1980)
31. Srivastava, K.C., *Prostagl. Leukotr. and Med.* 13, 227 (1984)
32. Liakopoulou-Kyriakides, M., Sinakos, Z., Kyriakidis, D.A., *Phytochem.* 24(3), 600 (1985)
33. Dorsch, W., Weber, J., *Agents and Actions* 14, 626 (1984)
34. Dorsch, W., Adam, O., Weber, J., Ziegeltrum, Z., *Eur. J. Pharmacol.* 107, 17 (1985)
35. Heinzl, S., *Med. Mo. Pharm.* 9(5), 151 (1986)
36. Lautier, R., *Dermatosen* 33, 213 (1985)
37. Block, E., Ahmad, S., Jain, M.K., Crecely, R.W., Apitz-Castro, R., Cruz, M.R., *J. Am. Chem. Soc.* 106, 8295 (1984)
38. Apitz-Castro, R., Cabrera, S., Cruz, M.R., Ledezma, E., Jain, M.K., *Thromb. Res.* 32, 155 (1983)
39. Cavallito, C.J., Bailey, J.H., *J. Am. Chem. Soc.* 66, 1950 (1944)
40. Bordia, A., *Artherosclerosis* 30, 355 (1978)
41. Ariga, T., Oshiba, S., Tamada, T., *Lancet* 1981, 150
42. Wagner, H., Wierer, M., Fessler, B., *Planta med.* 53, 305 (1987)
43. Itoh, T., Tamura, T., Mitsuhashi, T., Matsumoto, T., *Phytochem.* 16, 140 (1977)
44. Richter, W.J., Schwarz, H., *Angew. Chem.* 90, 449 (1978)
45. Moore, T.L., O'Connor, J., *Org. Chem.* 31, 3587 (1966)
46. Bass, S.W., Evans, S.A., *J. Org. Chem.* 45, 710 (1980)
47. Freeman, F., Angeletakis, C.N., *J. Org. Chem.* 47, 4194 (1982)
48. Takata, T., Kim, Y. H., Oae, S., *Tetrahedron Lett.* 44, 4303 (1978)
49. Conkerton, E.J., Chapital, D.C., *J. Chromat.* 281, 326 (1983)
50. Kozuka, S., Takahashi, H., Oae, S., *Bull. Chem. Soc. Jap.* 43, 129 (1970)
51. Block, E., O'Connor, J., *J. Amer. Chem. Soc.* 96(12), 3921 (1974)
52. Block, E., Ahmad, S., Catalfamo, J.L., Jain, M.K., Apitz-Castro, R., *J. Am. Chem. Soc.* 108, 7045 (1986)
53. Freeman, F., Angeletakis, C.N., *Org. Magnet. Res.* 17/1, 53 (1981)
54. Roush, P.B., Musker, W.K., *J. Org. Chem.* 43(22), 4295 (1978)
55. Small, V.D., Bailey, J.H., Cavallito, C.J., *J. Am. Chem. Soc.* 69, 1710 (1947)
56. Freeman, F., Angeletakis, C.N., *J. Org. Chem.* 50, 798 (1985)
57. McAllan, D.T., Cullum, T.V., Dean, R.A., Fidler, F.A., *J. Am. Chem. Soc.* 73, 3627 (1951)
58. Jäger, H., *Arch. Pharm.* 288, 145 (1955)
59. Sekine, T., Ando, K., Machida, M., Kanaoka, Y., *Analyt. Biochem.* 48, 557 (1972)
60. Koch, P., Ciuffarin, E., Fava, A., *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 5971 (1979)
61. Kice, J. L., Cleveland, J.P., *J. Amer. Chem. Soc.* 95, 109 (1973)
62. Block, E., Weidman, S.W., *J. Amer. Chem. Soc.* 95, 5046 (1973)
63. Block, E., O'Connor, J., *J. Amer. Chem. Soc.* 96, 3929 (1974)
64. Stein, V.B., Narang, R.S., *Anal. Chem.* 54, 991 (1982)

65. Nelson, J.K., Getty, R.H., Birks, J.W., Anal. Chem. 55, 1767 (1983)
66. Wajon, J.E., Alexander, R., Kagi, R.I., J. Chromatogr. 319, 187 (1985)
67. Hiley, R.W., Cameron, A., J. Chromatogr. 107, 393 (1975)
68. Bandyopadhyay, A.N., Srirangajan, A., Sreenivasan, A., J. Chromatogr. 47, 400 (1970)
69. Macak, J., Kubat, J., Dobal, V., Mizera, J., J. Chromatogr. 286, 69 (1984)
70. Vernin, G., Metzger, J., Fraisse, D., Scharff, C., Planta med. 1986, 96
71. Chen, C.-C., Ho, C.-T., J. Chromatogr. 356, 455 (1986)
72. Wu, J.L.-P., Wu, C.-M., J. Chromatogr. 214, 234 (1981)
73. Möckel, H.J., J. Chromatogr. 317, 589 (1984)
74. Stewart, M., Ross, F., J. Chromatogr. 160, 199 (1978)
75. Miething, H., Dtsch. Apoth. Ztg. 125, 2049 (1985)
76. Jansen, H., Müller, B., Knobloch, K., Planta med. 1987, 559
77. Voigt, M., Wolf, E., Dtsch. Apoth. Ztg. 126, 591 (1986)
78. Pschyrembel, W., Klinisches Wörterbuch, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 1977
79. Bhat, K.N., Arroyave, C.M., Marney, S.R., Stevenson, D.D., Tan, E.M., J. Allergy Clin. Immunol. 58, 647 (1976)
80. Kay, A.B., Lee, T.H., J. Allergy Clin. Immunol. 70, 37 (1982)
81. Paterson, N.A.M., Wasserman, S.I., Said, J.W., Austen, K.F., J. Immunol. 117, 1365 (1976)
82. Schwartz, L.B., Lewis, R.A., Seldin, D., Austen, K.F., J. Immunol. 126, 1290 (1981)
83. Metcalf, D.D., Lewis, R.A., Silbert, J.E., Rosenberg, R.D., Wasserman, S.I., Austen, K.F., J. Clin. Invest. 64, 1537 (1979)
84. Proud, D., Lichtenstein, L.M., Fed. Proc. 43, 1807 (abstract) (1984)
85. Henderson, W.R., Kaliner, M., J. Immunol. 122, 1322 (1979)
86. Schleimer, R.P., MacGlashan, D.W., Peters, S.P., Pinckard, R.N., Adkinson, N.F., Lichtenstein, L.M., Am. Rev. Respir. Dis. 133, 614 (1986)
87. Peters, S.P., MacGlashan, D.W., Schulman, E.S., Schleimer, R.P., Hayes, E.C., Rokach, J., Adkinson, N.F., Lichtenstein, L.M., L. Immunol. 132, 1972 (1984)
88. Kay, A.B., Clin. Exp. Immunol. 6, 75 (1970)
89. Kay, A.B., Neutrophils and the Asthmatic Response; in: Highlights in Asthmology, Eds.: Michel, F.B., Bousquet, J., Godard, P., pp. 195, Springer Verlag, Berlin (1987)
90. Shaw, R.J., Cromwell, O., Kay, A.B., Clin. Exp. Immun. 56, 716 (1984)
91. Gleich, G. J., Loegering, D.A., Ann. Rev. Immunol. 2, 429 (1984)
92. Unanue, E.R., Am. J. Pathol. 83, 396 (1976)
93. Tonnel, A.B., Gosset, P., Joseph. M., Fourier, E., Capron, A., Lancet I, 1406 (1983)
94. Marom, Z., Shelhamer, J.H., Kaliner, M., J. Exp. Med. 159, 844 (1984)
95. Godard, P., Chaintreuil, J., Damon, M., J. Allergy Clin. Immunol. 70, 88 (1982)
96. Godard, P., Damon, M., Michel, F.B., Clin. Res. 31, 548 (1983)

97. Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, J.H., *Nature* 286, 264 (1980)
98. Palmer R.M.J., Stepney, R.J., Higgs, G.A., Eakins, K.E., *Prostaglandins* 20, 411 (1980)
99. Hedquist, P., Dahlen, S.E., Gustafsson, L., Hammarström, S., Samuelsson, B., *Acta physiol. scand.* 110, 331 (1980)
100. Holme, G., Brunet, C., Piechuta, H., Manson, P., Girad, Y., Rokach, J., *Prostaglandins* 20, 717 (1980)
101. Drazen, J.M., Austen, K.F., Lewis, R.A., Clark, D.A., Goto, G., Marfan, A., Corey, E.J., *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 77, 4354 (1980)
102. Williams, T.J., Piper, P.J., *Prostaglandins* 19, 779 (1980)
103. Peatfield, A.C., Piper, P.J., Richardson, P.S., *Brit. J. Pharmacol.* 77, 391 (1982)
104. Wanner, A., Maurer, D., Abraham, W.M., Szephalusi, Z., Sielczak, M., *J. Allergy clin. Immunol.* 72, 663 (1983)
105. Mathe, A.A., Hedquist, P. *Amer. Rev. Respirat. Diseases* 111, 313 (1975)
106. Strandberg, K., Hedquist, P., *Acta physiol. scand.* 100, 172 (1977)
107. Hardy, C., Robinson, C., Tattersfield, A., Holgate, S.T., *N. Eng. J. Med.* 311, 209 (1984)
108. Moncada, S., Vane, J.R., *Pharmacol. Rev.* 30, 293 (1979)
109. Piper, P.J., Vane R.J., *Nature* 232, 29 (1969)
110. Smith, A.P., Cuthbert, M.F., *Advances in Biosciences* 9, 213 (1973)
111. Goetzl, E.J., Weller, P.F., Valone, F.H., in: *Advances in Inflammation Research*, vol.1; Eds.: Weissmann, G., Samuelsson, B., Paoletti, R., Raven Press, New York 1979
112. Plaut, M., Lichtenstein, L.M., *Histamine and immune responses*, in: *Pharmacology of Histamine Receptors*, pp. 392; Eds.: Ganellin, C.R., Parsons, M.E., John Wright, London 1982
113. Frigas, E., Loegering, D.A., Gleich, G.J., *Lab. Invest.* 42, 35 (1980)
114. Vargaftig, B.B., Lefort, J., Chignard, M., Benveniste, J., *Eur. J. Pharmacol.* 65, 185 (1980)
115. Gateau, O., Arnoux, B., Deriaz, H., Benveniste, J., *Am. Rev. Respir. Dis.* 129, A3 (abstract)(1984)
116. Weber, N., *Pharmazie in unserer Zeit*, 15(4), 107 (1986)
117. Benveniste, J., Vargaftig, B.B., In: *Ether lipids. Biochemical and biomedical aspects*. S. 355-387, Eds. Mangold, K., Paltauf, F., Academic Press, New York, 1983
118. Gigl, G., *Pharmazie in unserer Zeit*, 14, 97 (1985)
119. Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M., Hanahan, D.J., *J. Immun.* 127, 1250 (1981)
120. Hartung, H.P., Parnham, M.J., Winkelmann, J., Englberger, W., Hadding, U., *Int. J. Immunopharmac.* 5, 115 (1983)
121. Ingraham, L.M., Coates, T.D., Allen, J.M., Higgins, C.P., Baehner, R.L., Boxer, L.A., *Blood* 59, 1259 (1982)
122. O'Flaherty, J.T., Lees, C.J., Miller, C.H., McCall, C.E., Lewis, J.C., Love, S.H., Wykle, R.L., *J. Immun.* 127, 613 (1981)
123. Smith, J.R., Bowman, B.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 104, 1495 (1982)

124. Smith, J.R., Bowman, B.J., Iden, S.S., Clin. Immun. Immunopath. 28, 13 (1983)
125. Vargaftig, B.B., Lefort, J., Touqui, L. Rotilio, D., Foque, F., Dumarey, C., Adnot, S., Cordeiro, R., Lagente, V., In: Adv. in Inflammation Research 10
126. Yasaka, T., Boxer, L.A., Baehner, R.L., J. Immun. 128(5), 1939 (1982)
127. Humphrey, D.M., McManus, L.M., Satouchi, K., Hanahan, D.J., Pinckard, R.N., Lab. Invest. 46, 422 (1982)
128. Samuelsson, B.: The leukotrienes - an introduction; in: "Leukotrienes and other Lipoxygenase products", Eds.: Samuelsson and Paoletti, pp 1, Raven Press, New York, 1982
129. Snyder, F., Med. Res. Rev., 5, 107 (1985)
130. Malone, B., Lee, T.C., Snyder, F., J. Biol. Chem. 260, 10952 (1985)
131. Mencia-Huerta, J.M., Hadji, L., Benveniste, J., J. Clin. Invest. 68, 1586 (1981)
132. Humus, J.L., Sadowski, S., Calavage, M., Goldenberg, M., Subers, E., Kuehl, F. A., Bonney, R.J., Biochem. Pharmacol. 32, 2319 (1983)
133. Levine, L., Biochem. Pharmacol. 32, 3023 (1983)
134. Magro, A.M., Int. J. Immunopharmacol. 4, 15 (1982)
135. Chakravarty, N., Agents and Actions 14, 429 (1984)
136. Arai, Y., Shimoji, K., Konno, M., Konishi, Y., Okuyama, S., Iguchi, S., Hayashi, M., Miyamoto, T., Toda, M., J. Med. Chem. 26, 72 (1983)
137. Dahlen, S.E., Hedqvist, P., Hammarström, S., Samuelsson, B., Nature 288, 484 (1980)
138. Weiss, J. W., Drazen, J.M., Coles, N., McFadden, E.C., Weller, P.F., Corey, E.J., Lewis, R.A., Austen, K.F., Science 216, 196 (1982)
139. Ring, J., O'Connor, R., Int. Arch. Allergy appl. Immun. 58, 322 (1979)
140. Siess, W., Roth, P., Weber, P.C., Thromb. Haemost. 45, 204 (1981)
141. Nugteren, D.H., Hazelhof, E., Biochem. Biophys. Acta 326, 448 (1973)
142. Kuhl, P., Shiloh, R., Iha, H., Murawski, U., Zilliken, F., Prostaglandins 28, 785 (1984)
143. Wierer, M., Dissertation Universität München 1988
144. Fessler, B., Dissertation Universität München 1988
145. Smith, R.J., Bowman, B.J., Iden, S.S., Biochem. Pharmacol. 33, 973 (1984)
146. Smith, R.J., Iden, S.S., Inflammation 5, 177 (1981)
147. Allen, R.C., in "Bioluminescence and Chemoluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications", Eds.: De Luca and McElroy, pp 63-73, Academic Press, New York (1981)
148. Cheson, B.D., Christensen, R.L., Sperling, R., Kohler, B.E., Babior, B.M., J. Clin. Invest. 58, 789 (1976)
149. Burden, D.T., Pardes, M.W., Br. J. Pharmacol. 41, 122 (1971)
150. Amdur, M.O., Mead, J., Am. J. Physiol. 192, 364 (1959)
151. Koller, E.A., Helv. Physiol. Acta 20, 97 (1962)

152. Dorsch, W., Waldherr, U., Rosmanith, J., Pflügers Arch. 391,
236 (1981)
153. Waldherr, U., Dissertation Universität München 1977

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Meinem Doktorvater Herrn Prof Dr. H.Wagner für das große Interesse an dieser Arbeit und deren stets großzügige Förderung.

Herrn Dr. med. habil. W. Dorsch, Pädiatrische Abteilung der Poliklinik München, für die Leitung der in vivo Untersuchungen sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Dr. V. Wray, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, für die Aufnahme der 300 und 400 MHz-NMR-Spektren und seine engagierte Hilfe bei der Strukturaufklärung der Cepaene.

Herrn R. Stadler, Institut für Pharmazeutische Biologie, Lehrstuhl Prof. Dr. M.H. Zenk, für die Aufnahme der 360 MHz-NMR-Spektren.

Herrn Dr. O. Seligmann, Frau M. Greuter und Frau S. Maier für die Aufnahme der 80 MHz-NMR- und der Massenspektren sowie für ihre kollegiale Unterstützung.

Herrn Dr. A. Neszmelyi, Ungarische Akademie der Wissenschaften, Budapest, für die Durchführung der Konformationsanalysen.

Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbilchler, Max-Planck-Institut Martinsried, für die Aufnahme zweier 500 MHz-NMR-Spektren.

Den Doktoranden der medizinischen Fakultät G.Hein,
I. Oostendorp, P. Scheftner, W. Sieber und E. Weiß für die
Durchführung der in vivo Untersuchungen.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen B. Höckmeier,
E. Luxenburger, R. Mayer und S. Vollmer für die sorgfältige
und engagierte Durchführung der biologischen in vitro Unter-
suchungen.

Den Damen und Herren S. Brom, B. Kreil, H. Tympner und
G. Winkler u.a. für die Hilfe bei der Aufarbeitung von ca.
300 kg Zwiebeln von Allium cepa L..

Frau I. Kuner für die tatkräftige Unterstützung bei den
Synthesen und der Anfertigung der Abbildungen.

All den Freunden und Kollegen, die sich von meinem Dank für
ihre Hilfe angesprochen fühlen, die aber leider, wie so oft,
ungenannt bleiben.

Lebenslauf

Thomas B a y e r

geb. am 27. 09. 1957 in Dachau

Eltern: Werner Bayer, techn. Angst.
Bärbl Bayer (geb. Schmidt), kfm. Angst.

Schulbesuch: 1963-1968 Volksschule Dachau
1968-1977 Josef-Effner Gymnasium, Dachau

Wehrdienst: 1977/1978

Studium der
Pharmazie: WS 78/79 - WS 81/82 an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 1982

Pharmaziepraktikum: Juni 1982 - Mai 1983 in der Stern-Apotheke,
Dachau
3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 1983

Approbation: 4. August 1983

Berufsausübung: Juli 1983 - Dezember 1984 in der Stern-Apotheke, Dachau

Wissenschaftliche
Tätigkeit: Januar 1985 Beginn der vorliegenden Arbeit
unter Leitung von Prof. Dr. H. Wagner am
Institut für Pharmazeutische Biologie der
Universität München

